

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**“Impacto de la aplicación de biochar sobre comunidades microbianas
en suelo agrícola sujeto a diferentes niveles de fertilización
nitrogenada”**

Tesinista: BERGER, Micaela Gisela

Firma:

Directora: Dra. DOMINCHIN, María Florencia

Firma:

Codirectora: Dra. VERDENELLI, Romina

Firma:

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) y Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

**“Impacto de la aplicación de biochar sobre comunidades microbianas
en suelo agrícola sujeto a diferentes niveles de fertilización
nitrogenada”**

Tribunal Examinador:

Dra. PÉREZ HARGUINDEGUY, Natalia

Firma:

Dr. ZYGADLO, Julio Alberto

Firma:

Dr. DAMBOLENA, José Sebastián

Firma:

Calificación:

Fecha: 19/12/2019

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Sergio y Norma por brindarme siempre su apoyo incondicional, por enseñarme que cada esfuerzo tiene su recompensa y sobre todo que seamos siempre buenas personas, a mi hermana Melany, mi amiga del alma, que me acompañó desde el comienzo de esta carrera y aguantó todas mis locuras, a Luana mi hermanita más pequeña, gracias por apoyarme en todo momento.

A Flor, excelente directora pero por sobre todo excelente persona. Agradecerle por permitirme aprender de ella y por su constante paciencia y trabajo durante estos años para que la tesina sea todo un éxito.

A mi codirectora Romina y a José, por su constante disposición, paciencia y enseñanzas.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) y a la Cátedra de Química Orgánica por brindarme desde el inicio un espacio para poder desarrollar mi tesina.

A mis amigas, que me dieron su apoyo incondicional desde la distancia.

A Donald, amigo indispensable que me dejó la facultad, gracias por hacer de mis últimos años de carrera más divertidos y llevaderos.

A mis compañeros de la facultad, por cada momento compartido de aprendizajes, viajes, sufrimientos, risas y mates de por medio.

A Martín, persona incondicional en mi vida, gracias por aconsejarme y acompañarme todos estos años a lograr mi objetivo.

A mis abuelas y abuelo, simplemente gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	12
3.1 Hipótesis general.....	12
3.2 Predicciones.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 Recolección de muestras y diseño experimental.....	14
5.2 Elaboración del biochar.....	15
5.3 Variables analizadas.....	16
5.3.1 Propiedades físico-químicas.....	16
5.3.2 Actividades enzimáticas.....	17
5.3.3 Estructura de las comunidades microbianas.....	18
5.3.4 Análisis estadísticos.....	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1 Propiedades físico-químicas.....	20
6.2 Actividad enzimática.....	23
6.3 Biomasa y estructura de las comunidades microbianas.....	29
7. DISCUSIÓN.....	37
7.1 Propiedades físico-químicas.....	37
7.2 Actividad enzimática.....	39
7.3 Biomasa y estructura de las comunidades microbianas.....	43
8. CONCLUSIÓN.....	48

9. BIBLIOGRAFÍA.....	49
----------------------	----

RESUMEN

En Argentina, el incremento en el área sembrada de cultivos, el desplazamiento de la frontera agropecuaria y el dominio del cultivo de soja, ha ocasionado degradación de los suelos, pérdida de materia orgánica y del contenido de nutrientes, afectando de esta manera a las propiedades físico-químicas y a la dinámica funcional y estructural de la microbiota edáfica. El biochar (BC) es un material producido por la pirólisis de materia prima orgánica de diversa índole (excretas de animales, residuos de origen vegetal, lodos urbanos, desechos de industrias frigoríficas, madereras, entre otras) con la finalidad de ser utilizado como enmienda de suelos. Los nutrientes de origen orgánico contenidos en este tipo de enmiendas, deben ser transformados en nutrientes minerales en el suelo para poder ser asimilados por las plantas. En consecuencia, su incorporación a los cultivos es más paulatina y gradual que si proceden de abonos minerales, por lo que desde un punto de vista productivo, sería más lógico el empleo de éstos últimos. Sumado a lo anterior, en nuestro país, los modelos productivos actuales incluyen predominantemente la utilización de fertilizantes químicos. Es por esto que la aplicación combinada de enmiendas orgánicas con fertilizantes minerales podría ser planteada como una alternativa de manejo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto de la aplicación de diferentes dosis de biochar elaborado a partir de cáscaras de maní junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea) sobre las propiedades físico-químicas del suelo y sobre la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas edáficas en suelo de uso agrícola sujeto a diferentes tipos de manejo. El suelo recolectado perteneció a un mismo tipo textural e incluyó tres tipos de manejo: prístino, bajo siembra directa, con 10 años de rotación 2:1 (soja/maíz), y bajo laboreo intenso, sin rotación de cultivos y con labranza convencional. Los tratamientos fueron: control (sin urea y sin BC), urea (con urea y sin BC), BC sin urea (con BC al 0, 1 y 3%) y combinaciones (BC al 0, 1 y 3% con 0,2 g/kg de suelo de urea). La aplicación de biochar en ausencia de urea, redujo la acidez en los suelos, para todos los tipos de manejo analizados. Mientras que urea, sólo tendría este efecto bajo laboreo intenso. Ambos fertilizantes aplicados en conjunto, en general, incrementaron el contenido de carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT) en todos los tratamientos, particularmente en laboreo intenso. La aplicación de urea junto con biochar también aumentó la actividad de las enzimas del ciclo del C, del P y del N. Por su parte, la actividad específica de B-glucuronidasa no fue afectada por la presencia de urea, pero sí por la de biochar. A diferencia de lo observado en enzimas específicas, la actividad de enzimas generalistas fue muy variable dependiendo del tipo de manejo del suelo. Aunque en general puede observarse que dosis del 3% de biochar incrementan la actividad tanto FDA como DHA, la tendencia no fue clara al agregar urea. Por último, el biochar modificó la estructura de las comunidades microbianas,

principalmente bajo siembra directa y laboreo intenso, aunque en el suelo bajo éste último tipo de manejo fue menos evidente que bajo siembra directa. En general, se observaron aumentos de la abundancia de todos los taxones microbianos analizados al ser tratados con biochar. Por su parte, la aplicación de ambos fertilizantes en conjunto pareció no ejercer efecto significativo sobre la abundancia bacteriana, excepto para Bacterias Gram positivas y Actinobacterias en suelo prístino, donde se observaron incrementos de ambos taxones al agregar urea con biochar al 3%.

Los resultados de esta tesina muestran que la aplicación de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea) es capaz de modificar las características físico-químicas y microbiológicas del suelo, con énfasis bajo laboreo intenso. Sin embargo, aunque la aplicación de biochar y urea produce importantes incrementos del pH, COT, NT y de la actividad enzimática, tendencias similares pueden observarse al aplicar biochar sin el fertilizante mineral en todos los tipos de manejo analizados. Además, sólo el biochar parece afectar a la estructura de las comunidades microbianas. Por lo que el rol del biochar, sobre los cambios producidos en las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo, parece ser más determinante que el de la urea.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la demanda en la producción intensiva de cultivos es creciente y ocurre a escala mundial (Godfray *et al.* 2010). En Argentina, los modelos agrícolas más actuales, se han caracterizado por un marcado incremento en el área sembrada de cultivos, el corrimiento de la frontera agropecuaria y el dominio del cultivo de soja por sobre otras especies cultivables (Viglizzo *et al.* 2006, Manuel-Navarrete *et al.* 2007, 2009, Carreño *et al.* 2012). La interfase entre tierras manejadas -donde el sistema está motorizado por la energía del combustible-, y los ecosistemas naturales -en los que la fuente de energía es la radiación solar- es lo que tradicionalmente se llama frontera (Viglizzo *et al.* 2012). En nuestro país, el proceso de avance de la frontera agropecuaria prosigue sin pausa sobre tierras naturales, tierras boscosas y de pastoreo principalmente en las regiones del Gran Chaco, del Noroeste y del Noreste argentino (Viglizzo *et al.* 2012). Como consecuencia de la implementación de estas prácticas agrícolas se produce una pérdida de heterogeneidad en el paisaje natural, la cual trae aparejada una reducción de diversidad a escala agro-ecosistémica, especialmente la pérdida de numerosas especies silvestres que pueden vivir o subsistir en mosaicos agrícolas o mixtos. A su vez, la conversión de tierras naturales a tierras para la agricultura, especialmente a cultivos de cosecha, lleva a una rápida disminución del C edáfico (Lal 2002), con pérdidas de materia orgánica que oscilan entre el 10 y 55% (Burke *et al.* 1989, Brown & Lugo 1990, Reicosky 2016). En nuestro país, el reemplazo en el uso del suelo, de tierras naturales y ganaderas a tierras agrícolas, fue el cambio más notorio que experimentó la agricultura a lo largo del siglo 20 (Timm 2004). Como consecuencia de lo anterior, se ha observado degradación de la estructura de suelos, reducción de la capacidad de campo y del contenido de nutrientes..

Numerosas prácticas, principalmente ligadas al agregado de enmiendas orgánicas, han sido propuestas con el objeto de disminuir el deterioro edáfico (Mukherjee *et al.* 2014). El verdadero interés por este tipo de enmiendas radica en la incorporación de materia orgánica (MO) al suelo, pues la extracción de cultivos y rastrojos con las cosechas, hacen disminuir sus niveles en la matriz edáfica. En efecto, se ha reportado que la pérdida de MO estabilizada de los suelos cultivados es superior a la tasa de formación en suelos no perturbados (Gifford 1994, Reicosky 2016). Sumado a lo anterior, la MO forma complejos con los minerales de los suelos, incrementando la retención de nutrientes, disminuyendo la lixiviación y favoreciendo su asimilación por parte de los cultivos (Bot & Benites 2005). Sin embargo, los nutrientes de origen orgánico deben ser transformados en formas químicas menos complejas para poder ser asimilados por las plantas. En consecuencia, su incorporación a los cultivos es más paulatina y gradual que si proceden de fertilizantes minerales, por lo que desde un punto de vista productivo, sería más lógico el empleo de éstos últimos. Frente a este

escenario, numerosos estudios han evaluado el efecto de la aplicación de ambos tipos de fertilizantes (orgánicos y minerales) sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo (Arif *et al.* 2017, He *et al.* 2017, Sadaf *et al.* 2017). Por ejemplo, Li *et al.* (2017), combinaron un tipo de enmienda orgánica (biochar) con urea y observaron que el biochar tuvo efectos positivos sobre la actividad de enzimas del ciclo del N y del C cuando el suelo fue tratado con el fertilizante mineral nitrogenado. Mientras que, en suelos pobres en N, el efecto de esta enmienda orgánica sobre las enzimas del suelo fue adverso (Li *et al.* 2017). Aunque se ha sugerido que en suelos tratados con urea el biochar podría actuar como una “plataforma” de N facilitando las reacciones sustrato-enzima favoreciendo la actividad enzimática (Elzobair *et al.* 2016), los mecanismos que subyacen estas respuestas, aún son poco claros (Li *et al.* 2017). Pese a que en la última década se han desarrollado algunos estudios combinando biochar con enmiendas de distinta naturaleza, la información aún resulta ser escasa. Más aún en lo que respecta a los cambios operados sobre las propiedades físicas y químicas del suelo y a la conformación de la microbiota edáfica y su variación taxonómica.

El biochar, es un material producido por la pirólisis de materia prima orgánica de diversa índole (excretas de animales, residuos de origen vegetal, lodos urbanos, desechos de industrias frigoríficas, madereras, entre otras) con la finalidad de ser utilizado como enmienda de suelos (Ducey *et al.* 2013). En la última década, ha recibido una enorme atención por parte de numerosos grupos de investigación a nivel global, debido a sus efectos sobre la calidad y las propiedades del suelo (Zhu *et al.* 2017, Sadeghi *et al.* 2018). Químicamente, el biochar se compone de i) C fijo o estable, ii) C lábil y otros compuestos volátiles y iii) cenizas que incluyen minerales y cationes que se encuentran en menor proporción. Físicamente, la estructura del biochar se caracteriza por la presencia de un esqueleto cristalino, predominantemente de C, cubierto por poros de diferente tamaño a lo largo de todo su espesor (Qambrani *et al.* 2017). La fracción de C fijo o estable corresponde al C aromático y es la responsable de la naturaleza recalcitrante del biochar y en consecuencia, del secuestro y el almacenamiento de C en el suelo (Yanardağ *et al.* 2015). Diversos autores sugieren que el biochar es también capaz de estimular la actividad microbiana e incrementar, en última instancia, la productividad de los cultivos en suelos de uso agrícola (Kolb *et al.* 2009, Singh *et al.* 2010, Quilliam *et al.* 2012, H. Yu *et al.* 2019). Estos efectos beneficiosos de la enmienda sobre la calidad edáfica en general, han sido vinculados a dos mecanismos principales: 1) los poros presentes en las partículas de biochar pueden servir de hábitat para los microorganismos (Zhu *et al.* 2017) y 2) sus características intrínsecas y de superficie, como la presencia de carbonatos y su carga negativa, modifican las propiedades físicas y químicas del suelo (Quilliam *et al.* 2012, Zhu *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha observado que las partículas de biochar afectan a la capacidad de

intercambio catiónico, incrementando la retención de nutrientes (Liang *et al.* 2012, Zhu *et al.* 2017) y evitando su pérdida por lixiviación (Lehman, 2007). Además, es ampliamente aceptado que la adición de biochar produce un cambio en el pH del suelo (Chan y Xu, 2009). Este fenómeno se debe a la presencia de carbonatos y de grupos funcionales carboxilos (COOH) e hidroxilos (OH) (Yuan *et al.* 2011). Estas estructuras químicas hacen que el biochar sea en sí mismo alcalino y que a su vez, alcalinice al suelo en el que es aplicado. Además, es importante mencionar, que los últimos dos grupos funcionales citados, también son los responsables de las cargas negativas del biochar (Yuan *et al.* 2011). Las modificaciones operadas en el suelo luego de la aplicación del biochar, estarían relacionadas con cambios en la abundancia microbiana total (Lehmann 2007). Es altamente improbable que el cambio producido por el biochar sobre la biomasa microbiana se produzca de manera equitativa entre los diferentes filotipos y grupos microbianos. En este sentido, el análisis de perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos PLFA es un método bioquímico que provee información detallada acerca de la estructura de la comunidad microbiana y proporciona una medida sensible de los cambios en la comunidad en comparación con métodos de medición tradicionales (Vestal & White 1989). Recientemente, algunos estudios, empleando dicho análisis (Mitchell *et al.* 2015), han reportado que la aplicación de biochar se asocia con incrementos de la abundancia de algunos taxones microbianos tales como bacterias Gram-positivas (Ameloot *et al.* 2013), Gram-negativas (Watzinger *et al.* 2014), actinomicetes (Prayogo *et al.* 2014) y hongos (Steinbeiss *et al.* 2009) en suelos de diferente clase textural y contenido de MO. En lo que respecta al impacto del biochar sobre la actividad de enzimas específicas y generalistas del suelo, se ha propuesto que depende de la interacción del sustrato y de la enzima con el biochar y su relación con la porosidad y la superficie de contacto (mediante absorción y desorción del sustrato con el biochar y enlace de la enzima extracelular con la superficie del biochar) (Gul *et al.* 2015). Si bien algunos autores observaron que la aplicación de biochar es capaz de aumentar la respiración microbiana (Lu *et al.* 2015), otras investigaciones revelaron un efecto variable sobre la actividad de enzimas extracelulares (Masto *et al.* 2013, N. Ameloot *et al.* 2013). Existe un gran vacío de conocimiento acerca de la interacción entre el biochar y las enzimas del suelo, por lo que esta dirección en las investigaciones ha sido señalada de alta prioridad en la temática (Lehmann *et al.* 2011).

Es relevante mencionar que el biochar también afecta la dinámica del N en el suelo (Ulyett *et al.* 2014). Por ejemplo, diversas investigaciones han reportado que la utilización de esta enmienda puede modificar la tasa de mineralización del N (Prommer *et al.* 2014, Xu *et al.* 2014), disminuir la lixiviación de nitratos (Chen *et al.* 2010, Ventura *et al.* 2013), aumentar la inmovilización de N (Bruun *et al.* 2012, Zheng *et al.* 2013), incrementar la nitrificación y la oxidación de amonio a nitrato

(Dempster *et al.* 2012, Nelissen *et al.* 2012) y promover la volatilización y la pérdida de amonio a la atmósfera (Taghizadeh-Toosi *et al.* 2012). Sin embargo, otros autores han reportado que la aplicación a largo plazo de biochar a suelos agrícolas no afectó la concentración del N total, ni del amonio y los nitratos, afectando levemente el funcionamiento de los agroecosistemas (Jones *et al.* 2012). Según estudios más recientes, la manera en la que el biochar es capaz de alterar el ciclado de N podría estar directamente relacionado a la calidad del suelo y a su contenido de MO (Nele Ameloot *et al.* 2015). Sin embargo hasta el momento, muy pocos trabajos han sido llevados a cabo para estudiar dicha relación.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis general

El agregado de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea) a suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo, modifica las características físico-químicas, incrementa la actividad enzimática y altera la estructura de las comunidades microbianas, con énfasis en aquellos suelos bajo siembra directa y laboreo intenso.

Predicciones

La aplicación de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea):

1. incrementa el pH, la CE y el contenido de COT y NT,
2. estimula la actividad de enzimas generalistas y específicas del ciclo del C, N y P,
3. altera la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas, incrementando la abundancia de algunos taxones,

con mayor énfasis en aquellos suelos bajo siembra directa y laboreo intenso.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el impacto de la aplicación de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado sobre la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo.

Objetivos específicos

En suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo, se evaluará el efecto de la aplicación de diferentes dosis de biochar, de fertilizante nitrogenado y de ambas enmiendas en conjunto sobre:

1. las propiedades físico-químicas del suelo y el contenido de macronutrientes.
2. la actividad enzimática microbiana.
3. la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras y diseño experimental

Las muestras de suelo fueron recolectadas en un establecimiento de producción agrícola ubicado 25 Km al sur de la ciudad de Córdoba, Argentina (31° 37' S; 64° 17' O). El suelo perteneció a un mismo tipo textural e incluyó tres tipos de manejo: suelo prístino (SP), suelo bajo siembra directa con 10 años de rotación 2:1 (soja/maíz) conducido en siembra directa (SSD), y suelo bajo laboreo intenso (sin rotación de cultivos, labranza convencional) (SLI). El suelo fue clasificado como Haplustol típico con textura franco-limosa (26% arcilla, 56% limo, 18% arena). Las muestras fueron colectadas en superficie entre 0 y 15cm, posteriormente fueron tamizadas con una malla de 5 mm y almacenadas en bolsas arpilleras en cámara fría a 4°C.

El experimento fue llevado a cabo en macetas plásticas, en invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (25±2°C). El biochar fue aplicado en dosis de 0, 1 y 3% respecto del peso total del suelo en cada maceta (500g). En este momento, las macetas fueron regadas hasta alcanzar el 60% de la capacidad de campo. Posteriormente, fueron pesadas cada dos días y regadas con agua destilada hasta recuperar el peso inicial de 500 g. El fertilizante nitrogenado utilizado fue urea (46%N, FERTIZA), y se aplicó en dosis de 0,2 g /kg de suelo, (dosis típica para suelos agrícolas de la región pampeana, García *et al.* 2010). En consecuencia, el experimento constó de los siguientes tratamientos: tres tipos de manejo (prístino, siembra directa y laboreo intenso), dos dosis de fertilizante mineral nitrogenado (sin urea y con urea), tres dosis de biochar 0, 1 y 3% y todas las combinaciones posibles. Es decir, en cada uno de los tipos de manejo estudiados las combinaciones fueron: control (sin urea y sin biochar), urea (con urea y sin biochar), biochar sin urea (con biochar al 0, 1 y 3%) y combinaciones (biochar al 0, 1 y 3% combinados con 0,2 g/kg de suelo de urea) (**Figura 1**). El tiempo de incubación fue de aproximadamente 20 semanas. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado (tres réplicas experimentales). Al finalizar la incubación, todas las muestras fueron almacenadas en cámara de frío a 4°C hasta su posterior análisis.



Figura 1: Esquema del diseño experimental propuesto. Se utilizó un suelo agrícola bajo tres tipos de manejo (prístino, siembra directa y laboreo intenso), dos dosis de fertilizante mineral nitrogenado (sin urea y con urea), tres dosis de biochar 0, 1 y 3% y todas las combinaciones posibles.

Elaboración del biochar

El biochar fue elaborado a partir de cáscaras de maní obtenidas de una industria manisera ubicada en la Provincia de Córdoba. Las mismas fueron trituradas con procesadora automática y posteriormente incubadas a 500°C en un horno en condiciones bajas de oxígeno y con corriente de nitrógeno durante 4 horas (Gul *et al.* 2015). Durante la pirólisis la temperatura incrementó a razón de 4°C/min. Una vez alcanzados los 500°C, la temperatura se mantuvo constante durante 30 minutos. El biochar fue caracterizado en base a su acidez, área de superficie y aromaticidad mediante la evaluación de sus cocientes elementales (H/C) (**Tabla 1**). Finalmente, las partículas obtenidas fueron trituradas en un mortero, posteriormente tamizadas (malla de aprox. 2 mm) y almacenadas en ausencia de humedad hasta el inicio del experimento.

Tabla 1. Características físico-químicas del biochar

Propiedades	Biochar
Ph	8,445
Conductividad eléctrica (dS.m)	0,89
C (%)	64,268
H (%)	4,2016
N (%)	1,4183
C/H	45,313
Ca ⁺ (mg. Kg ⁻¹)	20,8
Mg ⁺ (mg. Kg ⁻¹)	7,6
Na ⁺ (mg. Kg ⁻¹)	0,2
K ⁺ (mg. Kg ⁻¹)	19,8

Variables analizadas

Propiedades físico-químicas

Conductividad eléctrica y pH: para cada uno de los tratamientos y para el biochar, la determinación tanto del pH como de la conductividad eléctrica (CE) se realizó con un equipo Hanna HI8314. Para el pH se utilizó una relación 1:2,5 (suelo/biochar: solución extractora). Brevemente, 8 g de suelo/biochar fueron suspendidos en 20 ml de agua bidestilada, se agitó en vórtex por 30 segundos y se dejó reposar durante 2 horas. Para la CE se utilizó una relación de 1:5 (suelo/biochar: solución extractora). 8 g de suelo/biochar fueron suspendidos en 40 ml de agua bidestilada, se agitó y finalmente se dejó reposar durante 2 hs.

Cuantificación Nitrógeno Total (NT): se determinó por medio de un autoanalizador de nutrientes Smart Chem 200 (Westco, Scientific Instruments, Inc.). Para NT, el método se basó en la conversión de componentes orgánicos nitrogenados de origen biológico como aminoácidos, proteínas y péptidos, en amonio a través de un proceso de digestión ácida. El rango de aplicación es de 0,10 a 5 mg/l de NT. El método es acorde con US EPA 351.2, .Rev. 2.0 (1993). Brevemente, se disolvieron 134 g de sulfato de potasio (K₂SO₄) y 7,3 g de sulfato de cobre III pentahidratado

(CuSO₄ · 5H₂O) en 800 ml de agua y 134 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) y se llevó a volumen final de 1 litro. Se colocaron 10 ml de esta solución por cada muestra de suelo. Una vez colocados los tubos en el digestor, el proceso de digestión se realizó a 160°C durante media hora y 380°C durante 45 min.

Cuantificación Carbono Total (CT): se cuantificó mediante el autoanализador PE2400 SERIE II C, H, N, S. Perkin Elmer. Se transformó el contenido de carbono orgánico a contenido de materia orgánica, en porcentaje (%MO), mediante la relación: % MO= %C x 1,724. Luego se estimó en mg/g de suelo (Walkley & Black 1934).

Actividades enzimáticas

Análisis de actividad de enzimas específicas

Algunos derivados de 4-Metilumbelliferona (4-MU-β-D-glucopiranoside, 4-MU-fosfato, 4-MU-N-Acetil-β-D-glucosaminide y 4-MU-β-D xilopiranoside) fueron utilizados como modelos de sustratos para *B-glucuronidasa*, *fosfatasa*, *B-glucosidasa* y *B-xilanasa* acorde con el ensayo de enzimas con sustratos múltiples (Stemmer 2004). Brevemente, el suelo fresco (aprox. 500 mg) se mezcló con 2 ml de buffer sustrato y centrifugado por 4 min a 360 rpm. La reacción se detuvo con una mezcla de metanol y buffer fosfato (pH 6.1) y centrifugada nuevamente por 5 min a 3500 rpm. El sobrenadante obtenido se filtró e inyectó a un HPLC. Las condiciones de cromatografía fueron: fase móvil de buffer fosfato y metanol, Columna C-18 (HP-Hipersil), velocidad de caudal de 1 ml-1 min y el horno a 40 °C de temperatura. Los sustratos fueron estimados con un detector UV a 320 nm.

La actividad de la *enzima ureasa* fue determinada por el método propuesto por Kandeler & Gerber (1988) levemente modificado. Brevemente, un gramo de suelo fue incubado con una solución acuosa de urea por 2 h a 37°C. La reacción enzimática se detuvo con CLK 2 M y la determinación del amonio producido fue cuantificada en espectrofotómetro a 690 nm.

Análisis de actividad de enzimas generalistas

La actividad microbiana total se estimó por la *hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)* usando el procedimiento de Adam & Duncan (2001). Brevemente, 2 g de suelo fueron colocados en tubos cónicos con 15 ml de 60 mM buffer fosfato pH 7,6. Para comenzar la reacción se agregó el sustrato (FDA, 1000 µg ml⁻¹). Posteriormente, los tubos cónicos se colocaron en un incubador orbital a 30 °C por 20 min 100 rpm. Luego del tiempo de incubación, la reacción fue detenida por el

agregado de 15 ml de cloroformo/metanol, finalmente las muestras se centrifugaron a 2000 rpm. La actividad FDA fue estimada en espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer a 490 nm.

La actividad *deshidrogenasa (DHA)* se determinó de acuerdo a la técnica citada por Garcia *et al.* (1997). Brevemente, 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) fue agregado a 0,2 ml de una solución INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro-defeniltetrazolio) al 0,4% durante 24 h a 28 °C en oscuridad. El INTF formado (iodo-nitro-tetra-zolio-formazan) se extrajo con 10 ml de metanol mediante agitación rápida durante 1 min y filtrado mediante papel de filtro Whatman No. 5. El INTF fue estimado en espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer a 490 nm.

Estructura de las comunidades microbianas

Análisis de perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos

La estructura de las comunidades microbianas de suelo fue analizada mediante los perfiles de fosfolípidos de diferentes taxones, de acuerdo con la metodología utilizada por Zelles (1999). Los lípidos del suelo fueron extraídos mediante una mezcla de cloroformo:metanol:buffer fosfato (1:2:0,8), y posteriormente se separaron en un gradiente de polaridad mediante cromatografía en columna (Silicicacid, Sil350-Sigma). Las fracciones de glicolípidos, lípidos neutros y lípidos polares (fosfolípidos) fueron eluidas con cloroformo, acetona y metanol, respectivamente. Finalmente, los fosfolípidos fueron metilados e inyectados en un cromatógrafo gaseoso (equipado con columna CP-WAX y detector FID) para su identificación y cuantificación. Los perfiles lipídicos se contrastaron con un estándar específico (Bacterial Acid Methyl Esters Mix, Supelco) y se cuantificaron mediante un estándar interno (éster metílico del ácido nonadecanoico, Supelco).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Infostat versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), mediante un análisis de modelos mixtos a tres vías, con dosis de biochar, dosis de urea y tipo de manejo del suelo como factores principales. Para diferencias estadísticamente significativas se utilizó el test a posteriori paramétrico de comparación múltiple (LSD) ($p \leq 0.05$). Antes de realizar los análisis, se efectuó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) para cada una de las variables. Los PLFA individuales, PLFA totales, relación bacterias/hongos y bacterias Gram positivas / Gram negativas de los diferentes tipos de manejo fueron sujetos a un análisis de componentes principales (CP) para dilucidar los patrones de variación. Finalmente, las correlaciones de Pearson se usaron para evaluar las relaciones entre los tratamientos y las variables fisicoquímicas y microbiológicas.

RESULTADOS

Propiedades físico-químicas

Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (CP) explicaron el 95,5% de la variación total (CP1 88,4% y CP2 7,1%) (**Figura 2**). Como puede observarse en la figura, hacia el extremo positivo de la componente 1 se observan al pH, CE, COT y NT, mientras que en el extremo opuesto, se ubica la relación C/N. Aunque no se evidenció una separación clara entre los tratamientos con y sin urea, o con y sin biochar, si se observó una separación clara entre los diferentes tipos de manejo aplicados al suelo. De la Figura 2 emerge que siembra directa y laboreo intenso serían diferentes a prístino, encontrándose todos los tratamientos de este último suelo agrupados en los cuadrantes 2 y 4, a su vez, más asociados al pH, CE y NT. Mientras que siembra directa y laboreo intenso se agrupan en los cuadrantes 1 y 3 sin observarse una asociación entre las variables y los diferentes tratamientos (**Figura 2**).

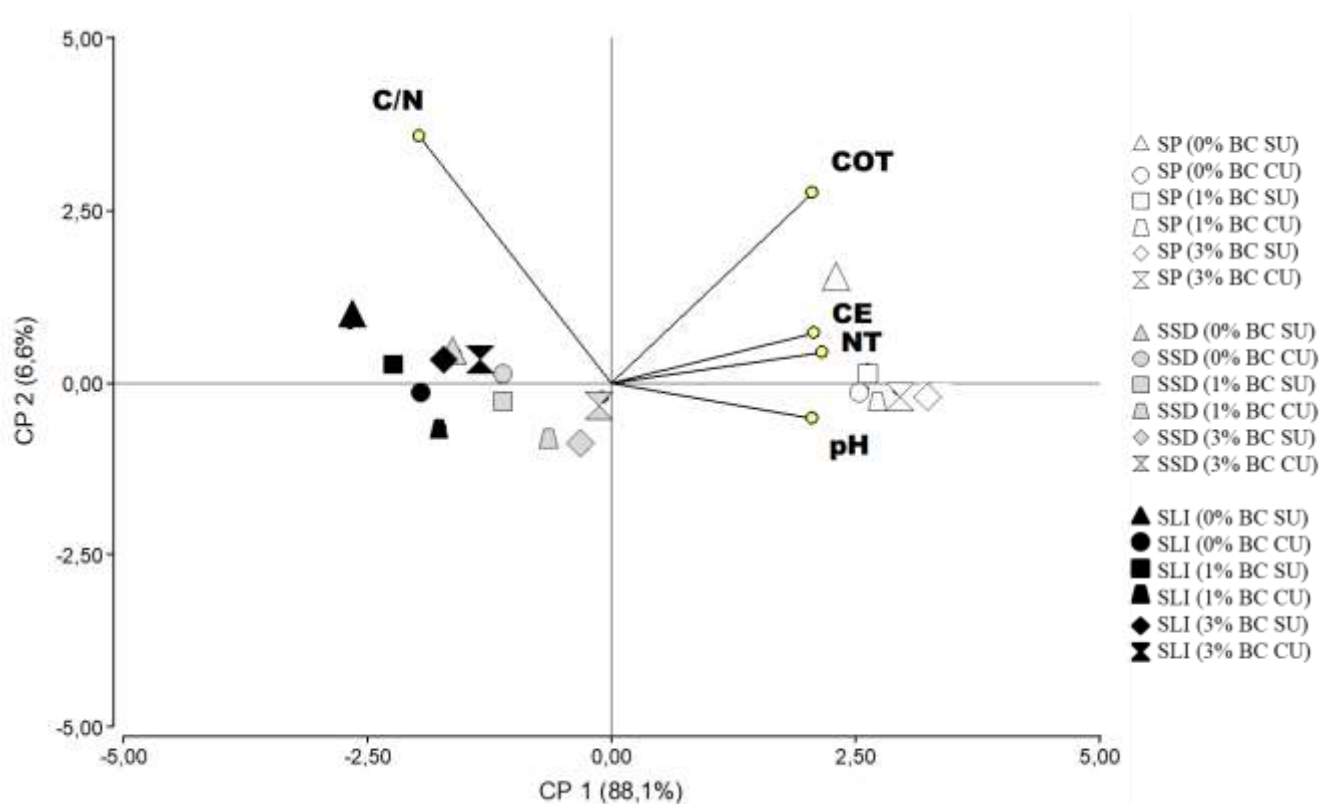


Figura 2. Análisis de componentes principales de propiedades físico-químicas en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y urea. SP: prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso. SU: sin urea. CU: con urea. BC: biochar. COT: carbono orgánico total, MO: materia orgánica, NT: nitrógeno total, CE: conductividad eléctrica, C/N: relación carbono total- nitrógeno total.

pH

En el presente trabajo, el pH varió según el tipo de manejo y la dosis de biochar aplicada, con una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 2**). Los valores para esta variable aumentaron en proporción directa con la dosis de biochar en todos los tipos de manejo analizados. Es decir, para todos los casos, los valores más bajos de pH se registraron con las dosis menores de biochar y los valores más altos se evidenciaron con las dosis más altas de biochar (**Figura 3**). El pH, también varió con el tipo de manejo del suelo y la aplicación de urea, registrándose una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 2**). Bajo laboreo intenso, el agregado de urea, incrementó significativamente el pH con respecto a los tratamientos sin urea (**Figura 3**).

	COT (%)	MO (%)	NT (%)	pH	CE	C/N
Efectos principales						
Tipo de manejo	1115,09***	1120,50***	2632,65***	372,95***	1357,92***	63,13***
	SP>SSD=SLI	SP>SSD=SLI	SP>SSD>SLI	SP>SSD>SLI	SP>SSD>SLI	SLI>SSD>SP
Biochar	15,70 ns	15,67 ns	60,87*** 3%≥1%≥0%	84,64*** 3%>1%=0%	6,36 ns	10,03*** 0%>3%=1%
Urea	29,36 ns	30,42 ns	2,99 ns	3,40 ns	56,91 ns	12,66*** SU>CU
Interacción bifactorial						
Tipo de manejo*biochar	4,29*	4,29*	5,97***	9,74***	7,61***	0,63 ns
Tipo de manejo*urea	16,26***	15,80***	0,78 ns	12,27***	21,11***	0,76 ns
Biochar*urea	9,16***	9,46***	11,33***	0,90 ns	2,66 ns	6,14**
Interacción trifactorial						
Tipo de manejo*biochar*urea	2,90*	2,81*	4,89**	1,86 ns	1,99 ns	0,85 ns

Tabla 2: Propiedades físico-químicas del suelo debido a diferentes tipos de manejo, dosis de biochar, dosis de urea y de su interacción. SP: prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso, COT: carbono orgánico total, MO: materia orgánica, NT: nitrógeno total, CE: conductividad eléctrica, C/N: relación Carbono total- Nitrógeno total. Los valores numéricos expresados en la tabla corresponden al estadístico F. Los asteriscos indican el nivel de significancia P. ***corresponde a un

nivel de significancia <0,001. **corresponde a un nivel de significancia <0,01.*corresponde a un nivel de significancia <0,05. ns: no significativo.

Conductividad eléctrica (CE)

La CE varió según el tipo de manejo del suelo y la dosis de biochar con una interacción significativa de ambos factores (**Tabla 2**). Los valores menores de CE fueron registrados bajo laboreo intenso, y luego en siembra directa. En ninguno de los dos suelos se observaron diferencias significativas al incrementar la dosis de biochar. No obstante, en el suelo prístino se observó que a mayor dosis de biochar, menor CE (**Figura 4**). Así mismo, esta variable fue afectada por el tipo de manejo y la dosis de urea, con una interacción significativa entre ambos factores. Bajo siembra directa, el agregado de urea, incrementó significativamente la CE con respecto a los tratamientos sin urea. Para el suelo prístino y laboreo intenso se observó la misma tendencia, aunque no fue significativa (**Figura 4**).

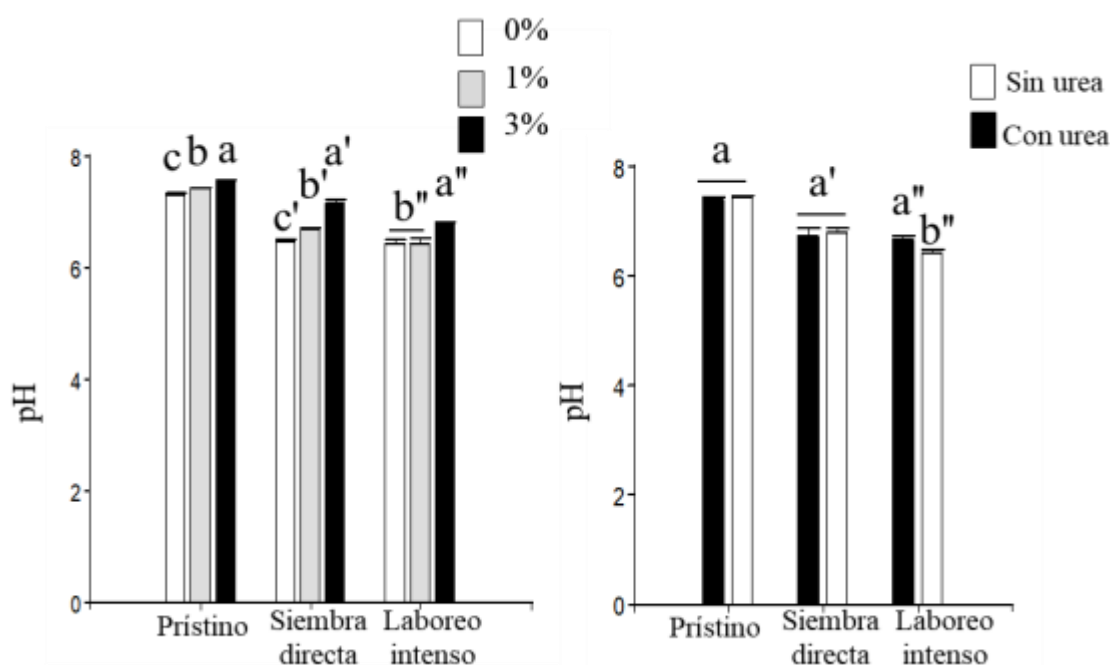


Figura 3: pH en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar (panel izquierdo) y con urea (panel derecho). Letras distintas indican diferencias significativas para el pH entre las dosis de biochar o entre los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado dentro de cada tipo de manejo (panel izquierdo y derecho respectivamente; $p < 0,05$).

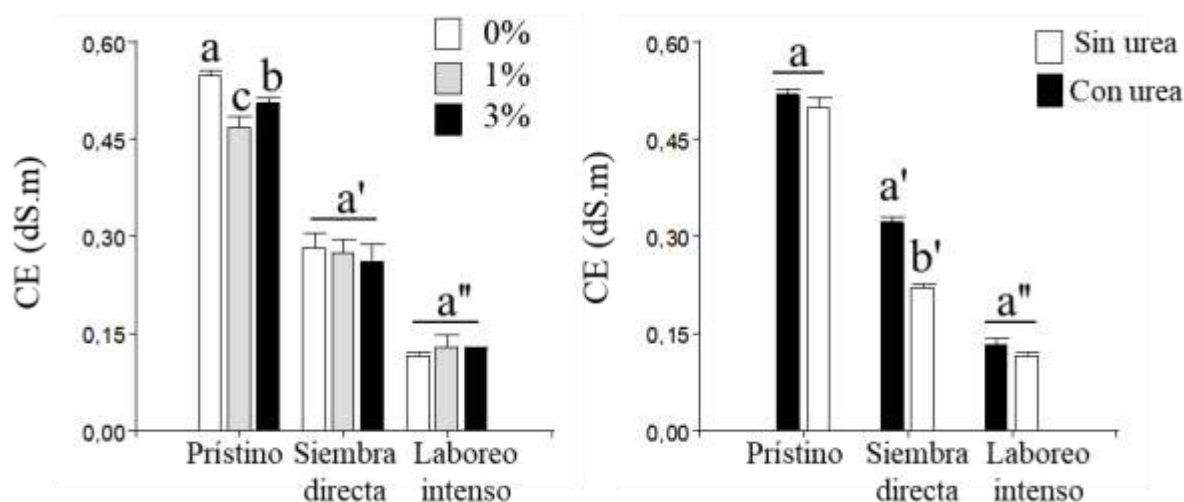


Figura 4: Conductividad eléctrica (CE) en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar (panel izquierdo) y con urea (panel derecho). Letras distintas indican diferencias significativas para la CE entre las dosis de biochar o entre los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado dentro de cada parcela (panel izquierdo y derecho respectivamente; $p < 0,05$).

Materia Orgánica (MO), Carbono Orgánico Total (COT), Nitrógeno Total (NT)

En el presente trabajo, MO y COT variaron según el tipo de manejo, la dosis de biochar y la dosis de urea con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 2**). Ambas variables incrementaron significativamente bajo siembra directa y bajo laboreo intenso luego de la aplicación de urea en combinación con biochar en su dosis máxima (3%). Así mismo, bajo laboreo intenso, la aplicación de biochar al 3% en ausencia de urea incrementó tanto el COT como la MO (**Figura 5**). De manera similar a lo observado para MO y COT, el NT varió según el tipo de manejo, la dosis de biochar y la dosis de urea con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 2**). En general, se observa en todos los tratamientos, que el NT incrementa significativamente al agregar biochar al 3%, tanto en presencia de urea como en ausencia de ésta. Particularmente en suelo prístino con urea, la dosis del 1% tuvo el mismo efecto (**Figura 5**). Por último, bajo siembra directa el agregado de biochar junto con urea, no tuvo efecto significativo sobre el contenido de NT (**Figura 5**). La relación C/N fue analizada (**Tabla 2**), se observó que en todos los tratamientos sin urea, dicha relación disminuyó significativamente al incrementar la dosis de biochar.

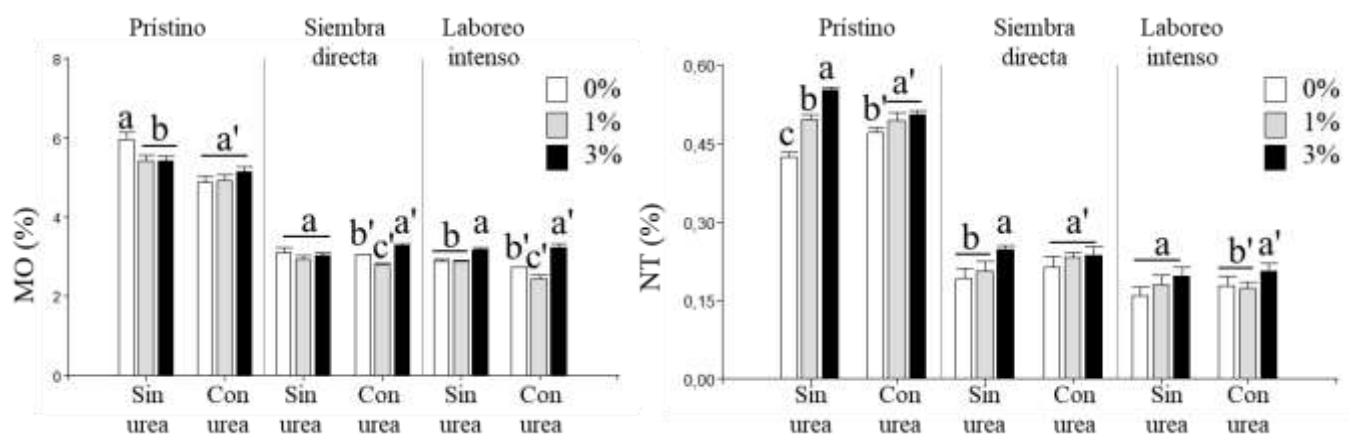


Figura 5: Contenido de materia orgánica (MO) y de nitrógeno total (NT) en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratado con biochar y urea. Panel izquierdo: Contenido de materia orgánica (MO). Panel derecho: Nitrógeno Total (NT). Letras distintas indican diferencias significativas entre las dosis de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p < 0,05$).

Actividad enzimática

Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (CP) explicaron el 74,5% de la variación total (CP1 37,7% y CP2 36,8%) (**Figura 6**). De manera similar a lo observado para las variables físico-químicas, este análisis evidenció una separación clara entre los diferentes tipos de manejo del suelo. Como puede observarse en la Figura 6, la primera componente (CP1) separa a prístino del resto de los manejos. A su vez, este eje separa la actividad de enzimas generalistas (DHA y FDA), a B-glucosidasa y a ureasa del resto de las enzimas. De este modo, el suelo prístino con 3% de biochar se relaciona con DHA, FDA, B-glucosidasa y ureasa. Mientras que siembra directa y laboreo intenso con 3% de biochar, se relacionan con fosfatasa, B-glucuronidasa y B-xilanasa. Por último, como puede observarse en la figura, hacia el extremo positivo de la componente 2 se agrupan los tratamientos con dosis del 3% de biochar (en el primer y segundo cuadrante). Mientras que los tratamientos al 0% se ubican en su mayoría, en el tercer y cuarto cuadrante. De la figura 6 emerge que siembra directa y laboreo intenso serían diferentes a prístino y que a su vez, todos los tipos de manejo tratados con 3% de biochar serían diferentes del resto de los tratamientos.

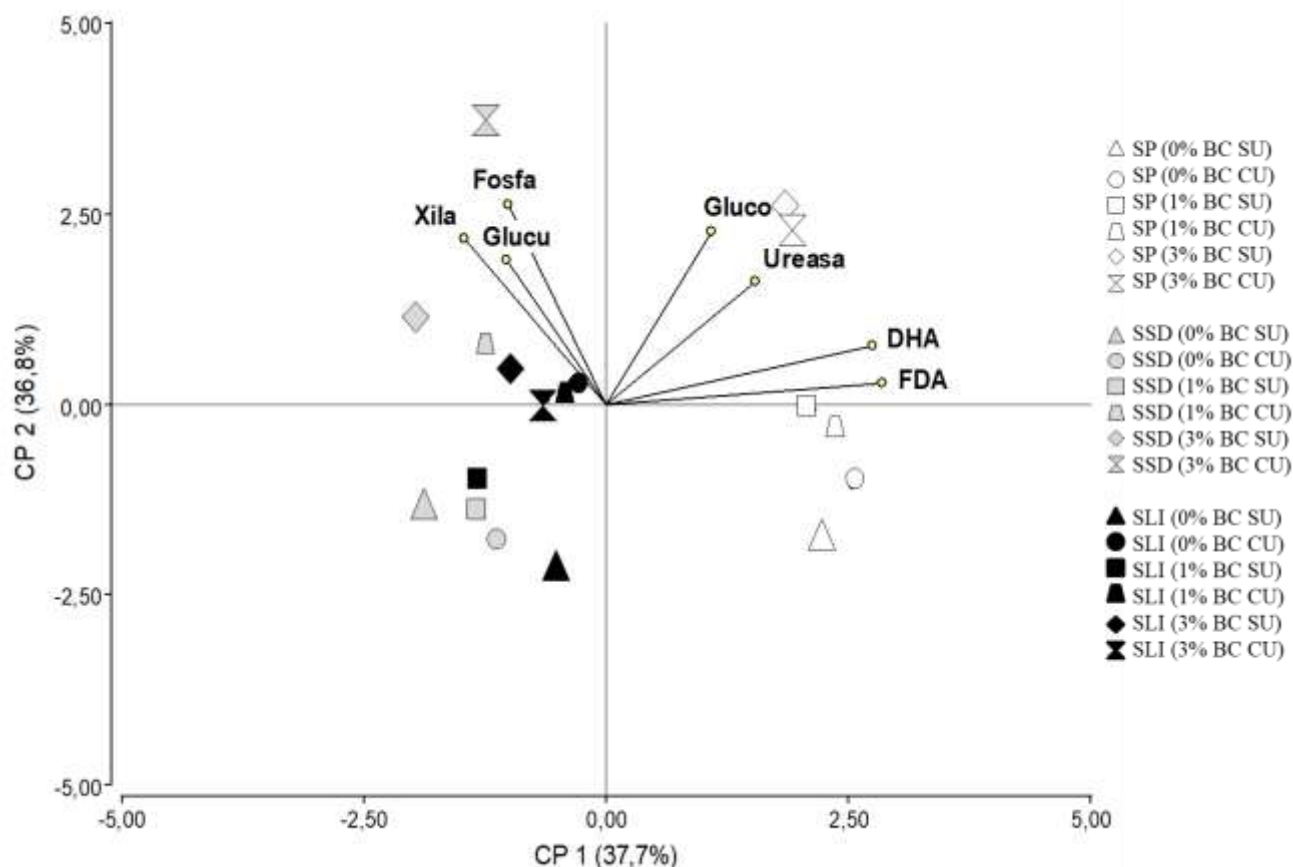


Figura 6. Análisis de componentes principales de actividad enzimática en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y con urea. SP: suelo prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso. SU: sin urea. CU: con urea. BC: biochar. FDA: Actividad hidrolizante del diacetato de fluoresceína. DHA: Actividad deshidrogenasa. GLUCO: Actividad B-glucosidasa. GLUCU: Actividad B-glucuronidasa. XILA: Actividad B-xilanasa. FOSFA: Actividad fosfatasa. UREASA: Actividad ureasa.

Actividad específica de enzimas del Ciclo del C: B-glucosidasa, B-xilanasa y B-glucuronidasa

La actividad de las enzimas, B-glucosidasa y B-xilanasa varió según el tipo de manejo, la dosis de biochar y la aplicación de urea, con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 3**). Los valores máximos de actividad B-glucosidasa y B-xilanasa fueron observados en suelo prístino, en los tratamientos con la dosis más alta de biochar (3%), tanto en ausencia como en presencia de urea (**Figura 7**). Específicamente para la enzima B-glucosidasa, en suelo prístino y bajo siembra directa enmendados con urea, se observó que la actividad incrementó significativamente en relación directa con la dosis de biochar aplicada (**Figura 7**). En ausencia de urea, bajo siembra directa, solamente la aplicación de la dosis más alta de biochar (3%) incrementó la actividad. Mientras que en suelo prístino, ambas dosis de la enmienda, tuvieron el mismo efecto. Por último,

bajo laboreo intenso la aplicación conjunta de ambas enmiendas no tuvo un efecto significativo sobre la actividad de esta enzima. La actividad B-glucosidasa mostró una correlación positiva con el pH, la CE y el contenido de COT y NT ($r = 0,66; 0,41; 0,46; 0,54$. $p < 0,004$). Para la actividad de la enzima B-xilanasa, en general, se observó que en todos los tipos de manejo el agregado de urea y biochar al 3% incrementaron significativamente la actividad (**Figura 7**). Mientras que el efecto de la aplicación del biochar en ausencia del fertilizante mineral nitrogenado, pareció variar según el tipo de manejo del suelo. La actividad B-xilanasa fue relacionada con el pH, CE, el contenido de COT y NT. Mientras que la correlación con el pH y la CE no fue significativa, con el contenido de COT y NT fue negativa ($r = -0,31; -0,26$. $p < 0,004$). Por último, la actividad de la enzima B-glucuronidasa varió según el tipo de manejo y la dosis de biochar, con una interacción significativa entre los dos factores (**Tabla 3**). El agregado de urea no tuvo efecto significativo sobre la actividad de B-glucuronidasa. En suelo prístino y bajo siembra directa se observó que la actividad incrementó significativamente en relación directa con la dosis de biochar aplicada (**Figura 7**). Bajo laboreo intenso, no se observaron diferencias en la actividad enzimática entre el control y la dosis de aplicación del 1%. Mientras que, la dosis máxima (3%), disminuyó sobre la actividad de la enzima. La actividad enzimática de B-glucuronidasa fue correlacionada con el pH, CE, COT y el NT. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

	FDA	DHA	GLUCO	GLUCU	XILA	FOSFA	UREASA
Efectos principales							
Tipo de manejo	1632,26*** SP>SSD=SLI	116,31*** SP>SLI≥SSD	51,62*** SP>SSD=SLI	22,10*** SSD>SP=SLI	24,45*** SLI>SSD>SP	11,48 ns	165,19*** SP>SSD=SLI
Biochar	1,90 ns	2,62 ns	86,59*** 3%>1%>0%	27,61*** 3%=1%>0%	60,77*** 3%>1%=0%	67,25*** 3%>1%=0%	74,94 ns
Urea	0,76 ns	3,31 ns	0,75 ns	0,20 ns	6,49 ns	12,64 ns	949,86*** CU>SU
Interacción bifactorial							
Tipo de manejo* biochar	2,78**	1,17 ns	21,25***	32,19***	2,20 ns	6,42***	18,80***
Tipo de manejo* urea	0,73 ns	0,47 ns	15,19***	0,14 ns	1,93 ns	6,76**	64,03***
Biochar*urea	1,82 ns	1,44 ns	6,40**	0,55 ns	0,67 ns	5,64**	8,58***
Interacción trifactorial							
Tipo de manejo* biochar* urea	10,65 ***	4,66 **	9,96***	2,25 ns	9,11***	6,64***	8,54***

Tabla 3: Actividad enzimática del suelo debida a diferentes tipos de manejo, dosis de biochar y de urea y de su interacción. SP: prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso, FDA: Actividad hidrolizante del diacetato de fluoresceína. DHA: Actividad deshidrogenasa. GLUCO: Actividad B-glucosidasa. GLUCU: Actividad B-glucuronidasa. XILA: Actividad B-xilanasa. FOSFA: Actividad fosfatasa. UREASA: Actividad ureasa. Los valores numéricos expresados en la tabla corresponden al estadístico F. Los asteriscos indican el nivel de significancia P. ***corresponde a un nivel de significancia <0,001. **corresponde a un nivel de significancia <0,01.*corresponde a un nivel de significancia <0,05.ns: no significativo.

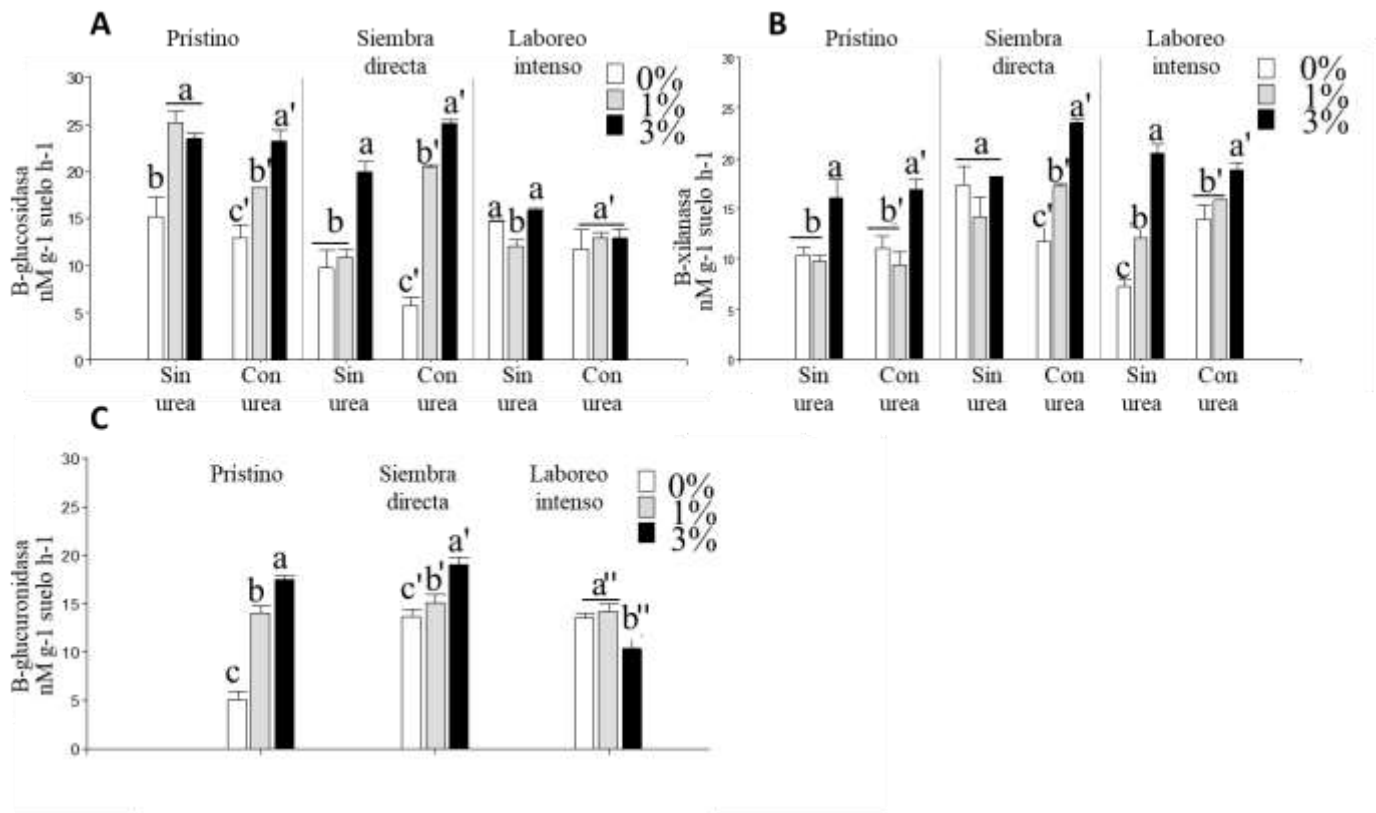


Figura 7: Actividad enzimática específica de enzimas del Ciclo del C en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y urea. Panel A: actividad B-glucosidasa. Panel B: actividad B-xilanasa. Actividad enzimática específica de enzimas del Ciclo del C en suelo agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar. Panel C: actividad B-glucuronidasa. Letras distintas indican diferencias significativas entre las dosis de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p < 0,05$)

Actividad específica de enzimas del Ciclo del N y P: Fosfatasa y ureasa

La actividad de la enzima fosfatasa varió según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea, con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 3**). En suelo prístino y bajo siembra directa, se observó que el agregado de biochar al 3% incrementó significativamente la actividad enzimática, tanto en ausencia como en presencia de urea (**Figura 8**). Bajo siembra directa, la dosis intermedia de biochar (1%) sólo tuvo efecto al ser agregado en conjunto con la urea. Finalmente, bajo laboreo intenso la actividad enzimática se vio incrementada sólo al enmendar el suelo con biochar, en ausencia de urea. Mientras que, por el contrario, al agregar el biochar con el fertilizante mineral nitrogenado, la actividad disminuyó. La actividad enzimática de la enzima fosfatasa fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación

de Pearson. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

La actividad de la enzima ureasa varió según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea, con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 3**). En todos los suelos, se observó que el agregado de biochar incrementó la actividad enzimática, tanto en presencia como en ausencia de urea. En suelo prístino y bajo siembra directa el mayor efecto se vio con dosis del 3% de biochar. Mientras que bajo laboreo intenso, cuando el biochar se aplicó junto con urea, la mayor actividad enzimática, fue registrada con la dosis intermedia (1%) (**Figura 8**). Por el contrario, cuando se aplicó en ausencia del fertilizante mineral nitrogenado, el mayor efecto se observó con la dosis más alta de biochar (3%). La actividad ureasa mostró una correlación positiva con el pH, la CE, el contenido de COT y el NT ($r=0,52; 0,45; 0,35; 0,45; p<0,01$).

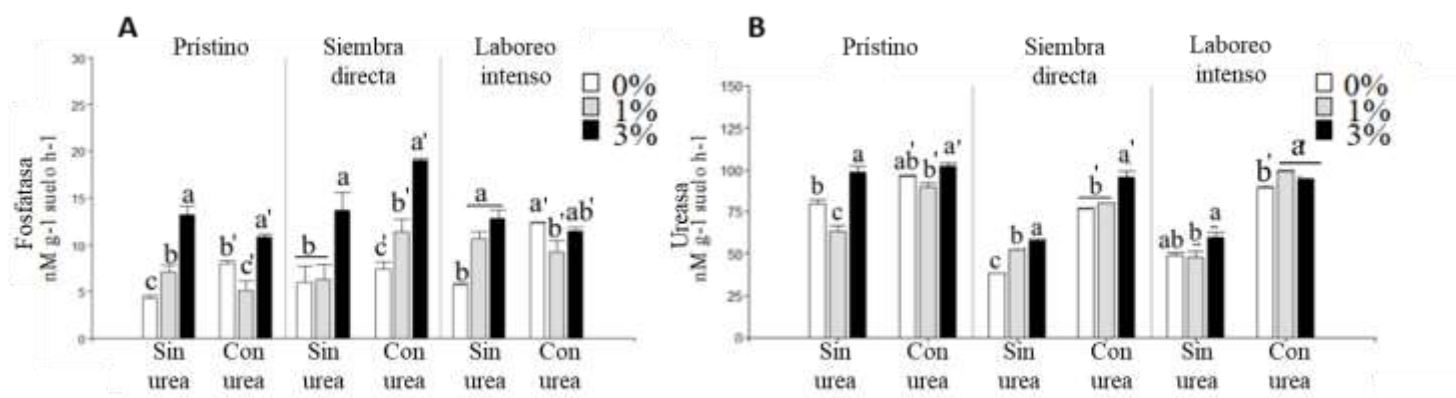


Figura 8: Actividad enzimática específica de enzimas del ciclo del P y del N en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y urea. Panel A: Actividad fosfatasa. Panel B: Actividad ureasa. Letras distintas indican diferencias significativas entre las dosis de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p<0,05$).

Actividad enzimática generalista: FDA y Deshidrogenasa

La actividad hidrolizante de FDA varió según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea, con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 3; Figura 9**). En nuestro estudio, los valores de actividad hidrolizante FDA bajo siembra directa, incrementaron significativamente al agregar urea en combinación con biochar en su dosis máxima de aplicación (3%). Tanto en este último tipo de manejo como bajo laboreo intenso, el agregado de biochar al 1%, incrementó la actividad FDA sólo cuando fue aplicado en ausencia de urea (**Figura 9**). Por último,

en el suelo prístino, la actividad FDA incrementó significativamente al aplicar biochar al 3% en ausencia de urea. La actividad enzimática FDA fue correlacionada con las propiedades físico-químicas evaluadas en este estudio. En tal sentido, el análisis de correlación de Pearson entre FDA y pH, CE, COT y NT mostraron una correlación positiva ($r=0,82$; $0,89$; $0,95$ y $0,95$. $p<0,0001$, respectivamente).

Al igual que para FDA, la actividad generalista de deshidrogenasa (DHA), varió según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea, con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 3; Figura 9**). En suelo prístino y bajo laboreo intenso sin urea, en general el agregado de biochar incrementó la actividad enzimática (**Figura 9**). Por el contrario, bajo siembra directa la actividad deshidrogenasa incrementó significativamente al aplicar urea con la dosis del 3% de biochar. La actividad enzimática DHA también fue correlacionada con las propiedades físico-químicas evaluadas en este estudio. En tal sentido, el análisis de correlación de Pearson entre DHA y pH, CE, COT y NT mostraron una correlación positiva ($0,78$; $0,68$; $0,82$ y $0,85$, $p<0,0001$, respectivamente).

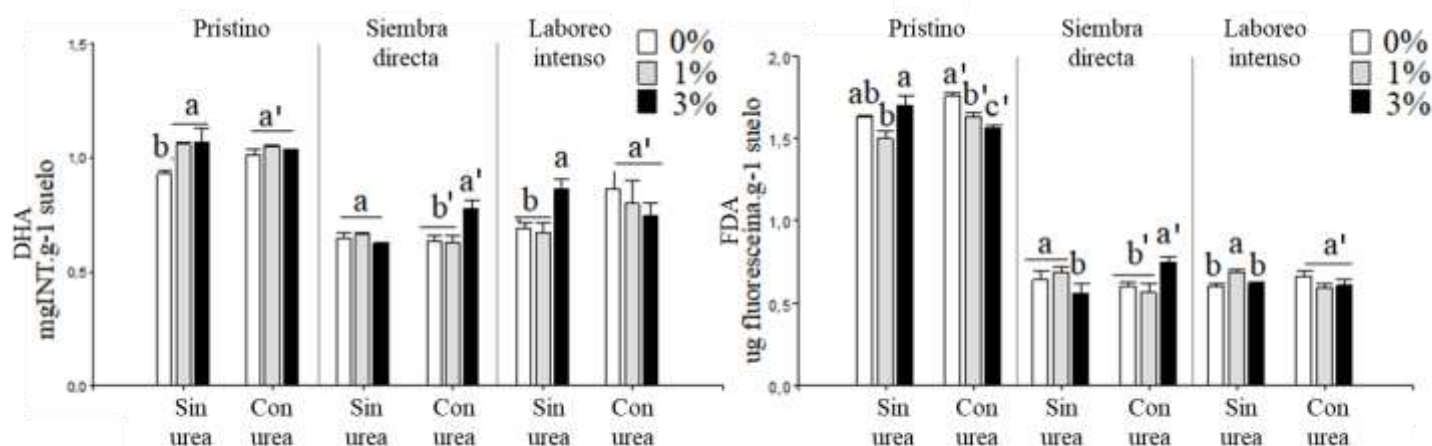


Figura 9: Actividad enzimática generalista en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y urea. Panel izquierdo: Actividad Deshidrogenasa (DHA). Panel derecho: Actividad hidrolizante FDA. Letras distintas indican diferencias significativas entre las dosis de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p<0,05$).

Biomasa y estructura de las comunidades microbianas

Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (CP) explicaron el 58,2% de la variación (CP1 32% y CP2 26,2%) (**Figura 10**). A diferencia de lo observado para las variables

físico-químicas y la actividad enzimática, aquí no se evidenció una separación clara entre los tipos de manejo del suelo. Tampoco entre tratamientos con y sin urea. Como puede observarse en la figura 10 la segunda componente (CP2) separa a todas las poblaciones de microorganismos, de la relación entre bacterias y hongos (B/H). A su vez, dicha componente separó a todos los tratamientos con biochar al 3% ubicándose en el primer y segundo cuadrante. Mientras que todos aquellos con 0% de esta enmienda, se agrupan en el tercer y cuarto cuadrante. De la figura 10 emerge que todos los tipos de manejo tratados con 3% de biochar serían diferentes del resto de los tratamientos, principalmente de aquéllos con el 0% de la enmienda.

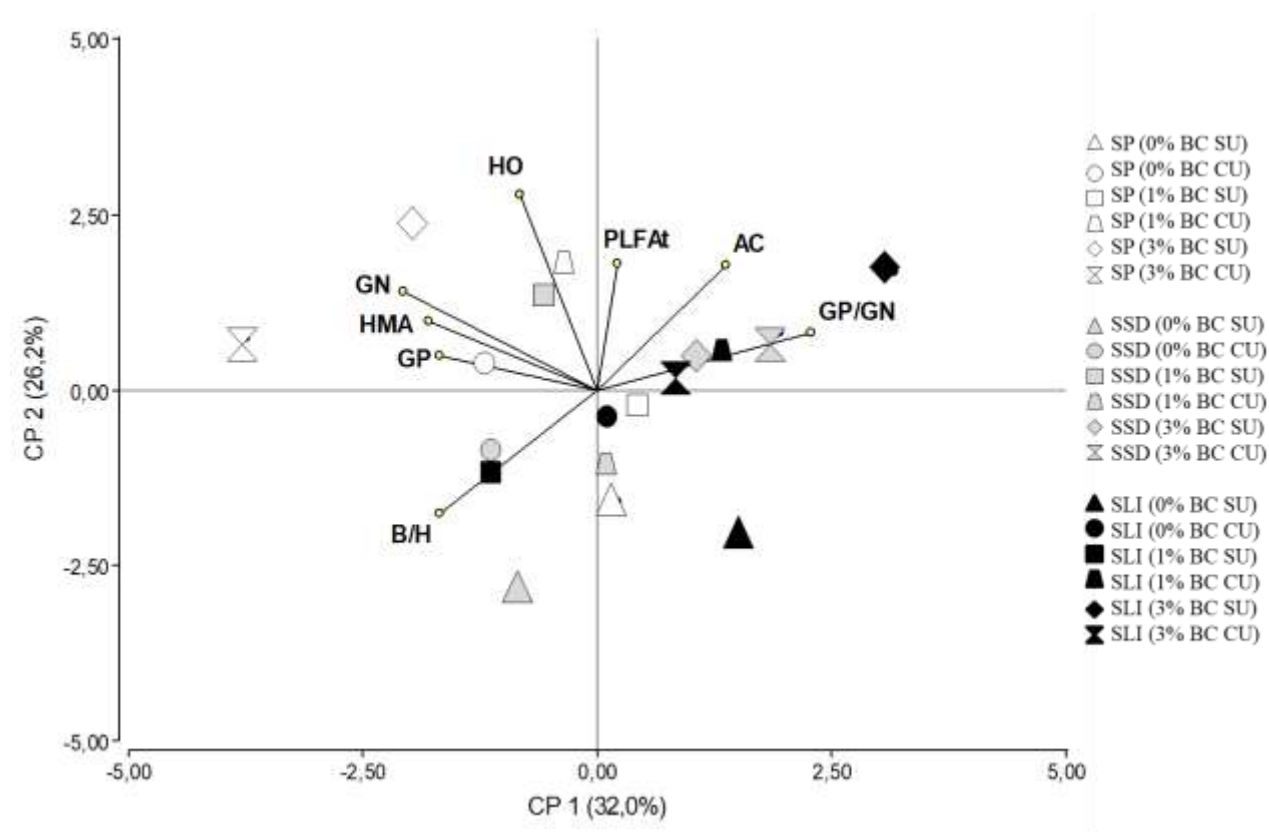


Figura 10. Análisis de componentes principales de la biomasa microbiana y estructura de las comunidades en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y con urea. SP: prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso. SU: sin urea. CU: con urea. BC: biochar. G+: Gram positivas. G-: Gram negativas. HO: hongos. AC: actinobacterias. HMA: hongos micorrícicos arbusculares. PLFA: PLFA totales. GP/GN: relación Gram-positivas/ Gram-negativas. B/H: relación bacterias/hongos.

Los análisis de perfiles fosfolípidos de ácidos grasos (PLFAs) para bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, actinobacterias y PLFA totales, variaron según el tipo de manejo, la dosis de biochar y la aplicación de urea con una interacción significativa entre los tres factores (**Tabla 4**).

	Bacterias Gram positivas (G+)	Bacterias Gram negativas (G-)	Hongos (HO)	Actino bacterias (AC)	Hongos micorrícicos arbusculares (HMA)	Gram positivas/ Gram negativas (G+/G-)	Bacterias/ hongos (B/H)	PLFA totales (PLFAt)
Efectos principales								
Tipo de manejo	21,03*** SP>SSD=SLI	14,98*** SP≥SSD≥SLI	4,49* SP≥SSD≥SLI	16,42*** SLI>SSD=SP	6,43** SP>SSD=SLI	10,69*** SLI≥SSD≥SP	0,12 ns	3,77* SP>SSD=SLI
Biochar	0,23 ns	21,70*** 1%>3%>0%	8,27** 3%>1%=0%	30,62*** 3%=1%>0%	3,92* 3%≥1%≥0%	3,71* 3%=1%>0%	2,86 ns	1,74 ns
Urea	88,98*** CU>SU	24,09*** CU>SU	5,85* CU>SU	0,05 ns	0,42 ns	0,08 ns	0,01 ns	0,24 ns
Interacción bifactorial								
Tipo de manejo* biochar	97,53***	19,89***	1,75 ns	3,28*	3,42*	4,20*	3,01*	4,45*
Tipo de manejo* urea	70,25***	25,61***	0,40 ns	7,22**	0,24 ns	0,79 ns	1,39 ns	4,68 *
Biochar* urea	180,55***	10,73***	5,95**	1,66 ns	0,03 ns	0,89 ns	2,99 ns	1,22 ns
Interacción trifactorial								
Tipo de manejo* biochar* urea	47,18***	7,5***	3,59*	3,98*	1,46 ns	2,39 ns	2,38 ns	4,45**

Tabla 4: Biomasa microbiana y estructura de las comunidades del suelo debida a diferentes tipos de manejo, dosis de biochar y de urea y de su interacción. SP: suelo prístino, SSD: siembra directa, SLI: laboreo intenso, G+: Gram positivas. G-: Gram negativas. HO: hongos. AC: actinobacterias. HMA: hongos micorrícicos arbusculares. PLFAt: PLFA totales. G+/G-: relación Gram-positivas/Gram-negativas. B/H: relación bacterias/hongos. Los valores numéricos expresados en la tabla

corresponden al estadístico F. Los asteriscos indican el nivel de significancia P. ***corresponde a un nivel de significancia $<0,001$. **corresponde a un nivel de significancia $<0,01$. *corresponde a un nivel de significancia $<0,05$. ns: no significativo.

Actinobacterias

Para todos los tipos de manejo analizados en la presente tesina, cuando el biochar se aplicó junto con urea, se observó un incremento en la abundancia de actinobacterias en relación directa con la dosis de biochar aplicada, sin embargo este resultado fue significativo solamente en suelo prístino. No obstante, cuando el biochar se aplicó en ausencia de urea, los resultados fueron estadísticamente significativos, siguiendo la misma tendencia. Es decir, a mayor dosis de biochar, mayor abundancia de actinobacterias (**Figura 11**). La abundancia de actinobacterias fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación de Pearson. Para el pH, no se observó una correlación significativa. Mientras que con la CE, COT y NT, se observó una correlación negativa ($r = -0,5$; $-0,5$; $-0,43$, respectivamente. $p < 0,01$).

Bacterias Gram Positivas y Gram negativas

La abundancia de bacterias Gram positivas y Gram negativas, exhibió un incremento al aumentar las dosis de biochar en el suelo prístino, ya sea en ausencia o en presencia de urea (**Figura 11**). Mientras que en el resto de los tratamientos, el efecto de ambas enmiendas sobre la abundancia de estas bacterias, pareció variar según el tipo de manejo. En suelo prístino, las bacterias Gram positivas incrementaron significativamente, en los tratamientos con y sin urea, particularmente al agregar biochar al 3%. Además, en los tratamientos sin urea, la dosis intermedia (1%), tuvo el mismo efecto (**Figura 11**). Bajo siembra directa, cuando el biochar fue aplicado en ausencia de urea, se observó un incremento de la abundancia bacteriana, siendo más significativo el efecto de la dosis intermedia de biochar. Curiosamente, cuando biochar y urea se aplicaron de manera conjunta, el efecto fue opuesto. Es decir, la abundancia bacteriana disminuyó al aumentar la dosis de biochar (**Figura 11**). Finalmente, bajo laboreo intenso, cuando el biochar fue aplicado en ausencia de urea, no se observó un efecto significativo sobre la abundancia de las bacterias Gram positivas. Mientras que al ser aplicado con urea en dosis del 1%, tuvo un efecto inhibitorio (**Figura 11**). La abundancia de bacterias Gram positivas fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación de Pearson. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

Para las bacterias Gram negativas, se observó que cuando el biochar fue aplicado junto con urea, no se registraron cambios significativos en su abundancia, en ninguno de los tipos de manejo analizados (**Figura 11**). En suelo prístino, cuando el biochar se aplicó en ausencia de urea, se observó que la abundancia de bacterias Gram negativas incrementó significativamente en relación directa con la dosis de biochar aplicada. Es decir, a mayor dosis de biochar, mayor abundancia bacteriana (**Figura 11**). Bajo siembra directa, la dosis del 1% de biochar no tuvo efecto significativo, mientras que la dosis del 3% ejerció un efecto inhibitorio. Es decir, la abundancia bacteriana disminuyó significativamente con respecto al control sin biochar. Por último, bajo laboreo intenso, la aplicación de biochar ejerció un efecto positivo sobre la abundancia bacteriana. Aunque la aplicación de biochar al 3% incrementó significativamente la abundancia bacteriana respecto al control, la dosis intermedia (1%) fue la que ejerció mayor efecto (**Figura 11**). La abundancia de bacterias Gram negativas fue relacionada positivamente con el pH, CE, COT y el NT ($r= 0,41; 0,35; 0,38$ y $0,57$ respectivamente; $p<0,05$).

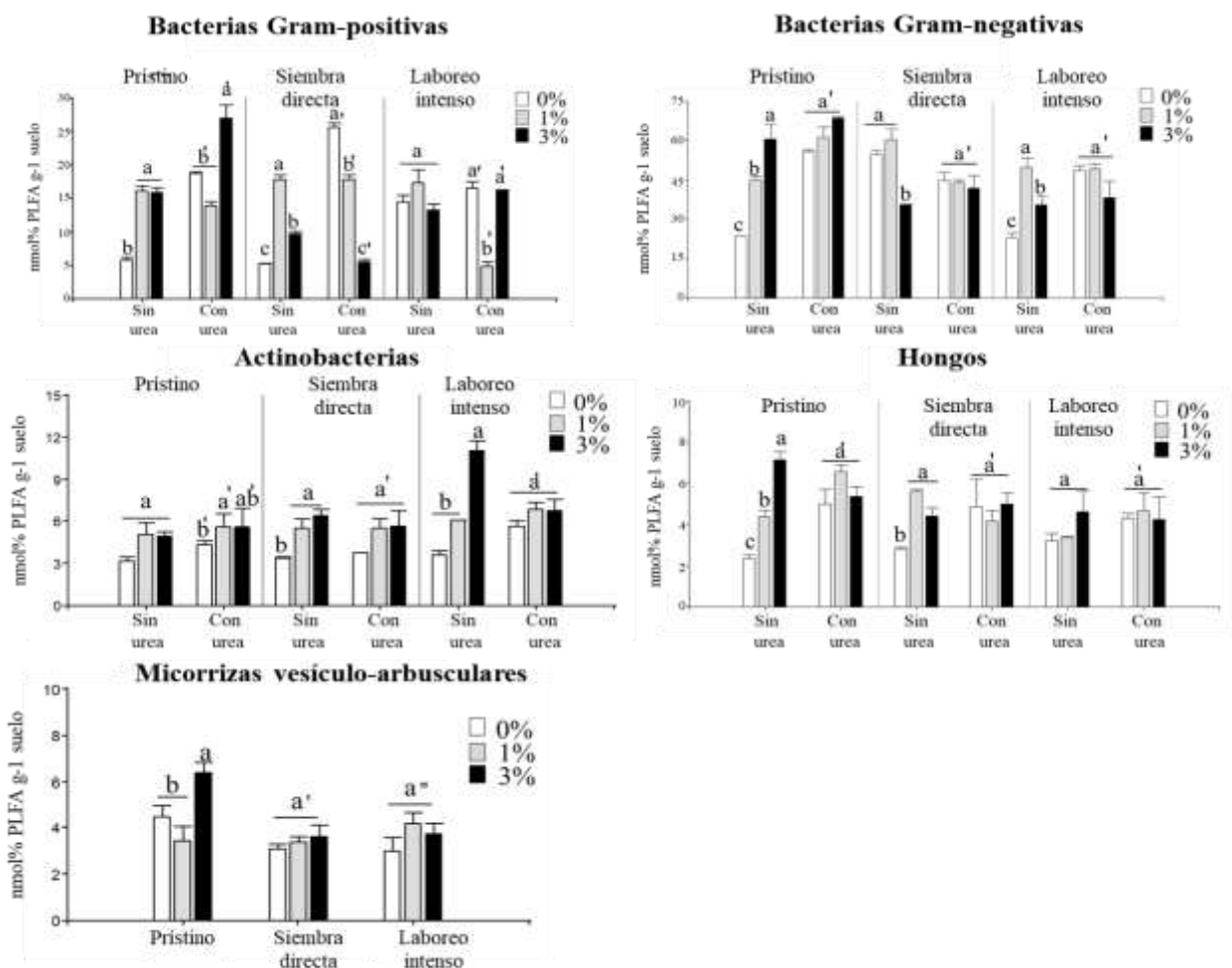


Figura 11: Abundancia de taxones microbianos en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo tratados con biochar y urea. Letras distintas indican diferencias significativas entre las dosis

de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p < 0,05$).

Por último, la relación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, fue analizada, observándose un efecto significativo de la interacción entre el tipo de manejo del suelo y la dosis de biochar (**Tabla 4**). De esta manera, se observó un mayor efecto de la aplicación del biochar sobre las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas. Así, en general, en suelo prístino y bajo siembra directa se detectó un aumento del cociente bacteriano al agregar biochar. Mientras que en suelo prístino la proporción aumentó con la dosis del 1%, bajo siembra directa, ambas dosis de aplicación de biochar tuvieron el mismo efecto. Finalmente, bajo laboreo intenso, aunque la proporción de Gram positivas/ Gram negativas pareció incrementar con biochar al 3%, el efecto no fue significativo (**Figura 12**).

Hongos

De manera similar a lo observado para bacterias Gram negativas, en la presente tesina, se observó que cuando el biochar fue aplicado junto con urea, no se registraron cambios significativos en la abundancia de hongos, en ninguno de los tipos de manejo analizados (**Tabla 4**). Mientras que en ausencia de urea, en el suelo prístino, se observó que incrementó significativamente en relación directa con la dosis de biochar aplicada, registrándose una abundancia máxima con la dosis del 3% de la enmienda. Bajo siembra directa, la abundancia fúngica incrementó significativamente tanto con la dosis del 1% como con la del 3%. Mientras que bajo laboreo intenso, sólo la dosis del 3% pareció incrementar la abundancia de hongos, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo (**Figura 11**). La relación entre bacterias y hongos, fue analizada, observándose un efecto significativo de la interacción entre el tipo de manejo del suelo y la dosis de biochar (**Tabla 4**). Solamente bajo siembra directa, ambas dosis de biochar produjeron una disminución de la relación bacterias/hongos (**Figura 12**), probablemente causado por el incremento de biomasa fúngica en dicho tratamiento. La abundancia de hongos fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación de Pearson. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

Hongos Micorrícicos Arbusculares

Los PLFAs para los hongos micorrícicos arbusculares variaron según el tipo de manejo del suelo y la dosis de biochar con una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 4**). Solamente en suelo prístino, el biochar aplicado al 3%, provocó un incremento significativo de la

abundancia (**Figura 11**). Bajo siembra directa y laboreo intenso, aunque se observó una tendencia similar, los cambios no fueron estadísticamente significativos. De manera similar a lo observado en hongos, la abundancia de hongos micorrícicos arbusculares fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación de Pearson. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

PLFAs totales

Finalmente, es ampliamente conocido que los PLFA totales son indicadores sensibles de la biomasa microbiana total. En suelo bajo siembra directa y laboreo intenso, en general se observó que a mayor dosis de biochar, mayor PLFA totales (**Figura 12**). Mientras que en suelo prístino, la enmienda con urea y biochar no afectó significativamente a esta variable. Particularmente bajo siembra directa, la dosis máxima de aplicación del biochar (3%) fue la que tuvo mayor efecto, tanto en el tratamiento sin como en el con urea. En cambio, bajo laboreo intenso, este efecto del biochar, sólo se observó en el tratamiento sin urea (**Figura 12**). La abundancia de los PLFA totales fue relacionada con el pH, CE, COT y el NT mediante un análisis de correlación de Pearson. Sin embargo, no se observó una correlación significativa con ninguna de las variables físico- químicas mencionadas.

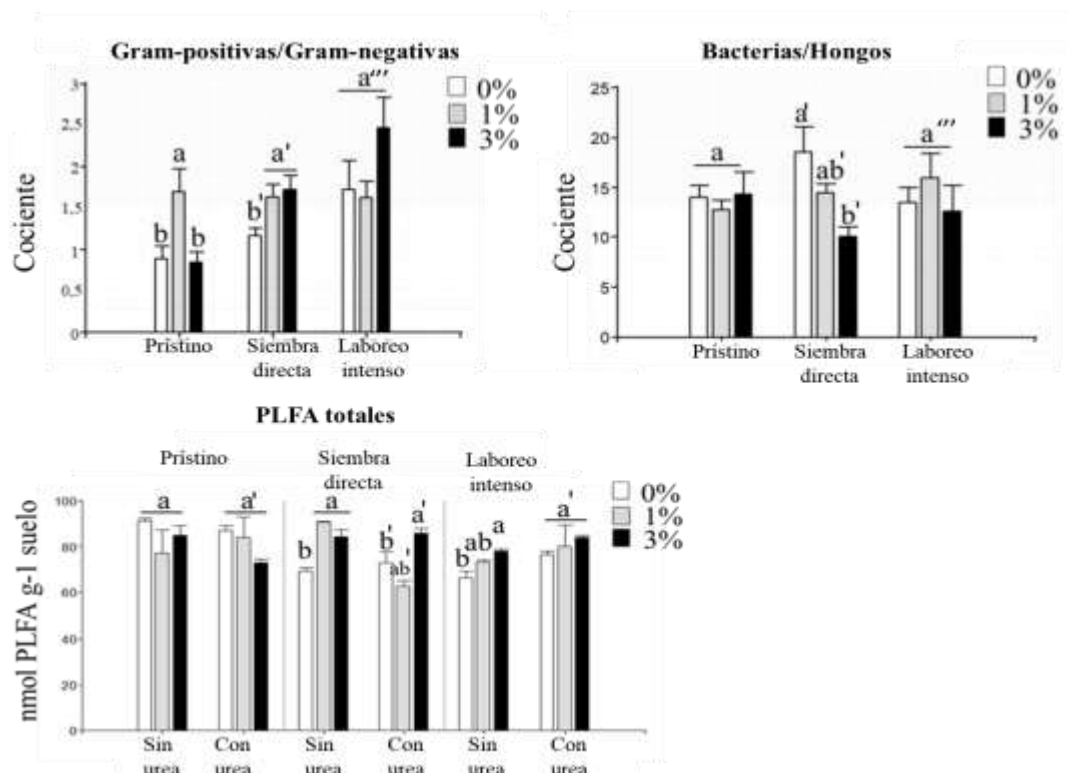


Figura 12: Estructura de las comunidades microbianas en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo del suelo tratados con biochar y urea. Letras distintas indican diferencias significativas

entre las dosis de biochar dentro de los tratamientos con el fertilizante mineral nitrogenado y dentro de cada tipo de manejo ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó el impacto de la aplicación de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea) sobre la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas en suelo de uso agrícola bajo diferentes tipos de manejo. Trabajos recientes que evalúan los efectos de ambos tipos de fertilizantes combinados, han sido principalmente focalizados sobre la respuesta de algunas variables químicas y enzimáticas del suelo (Song *et al.* 2016, S. Li *et al.* 2017), o bien, sobre los cambios en la estructura de las comunidades microbianas (Zhang *et al.* 2018). Sin embargo, pocos son los trabajos realizados hasta el momento que han integrado el estudio de todas estas variables en un suelo de uso agrícola sujeto a prácticas de manejo diversas. Hasta donde conocemos, la variabilidad que podría observarse en la respuesta de la microbiota edáfica al tratamiento con biochar y un fertilizante mineral nitrogenado, cuando los manejos aplicados al suelo son diferentes, ha sido poco estudiada hasta el momento.

Los resultados de este trabajo muestran que en general, la aplicación conjunta de biochar y urea favorece a la actividad bacteriana y a la estructura físico-química de suelo agrícola sujeto a prácticas de manejo diversas. Pese a lo anterior, los análisis de componentes principales realizados para los tres grandes grupos de variables aquí evaluadas (propiedades físico-químicas, actividad enzimática y estructura de las comunidades microbianas), muestran que los tipos de manejo aplicados al suelo se separan en grupos definidos, conservando cada uno su identidad. Es decir que la respuesta observada al tratamiento con fertilizantes, sería diferente según el tipo de manejo que se esté aplicando al suelo. Además, según dicho análisis, la variación de la estructura de las comunidades microbianas a la aplicación de ambos fertilizantes sería mayor que la de actividad enzimática y que las variables físico-químicas. Siendo éstas últimas, las menos afectadas por el tratamiento con fertilizantes. A continuación en las siguientes secciones, se discute el rol de ambos fertilizantes juntos y por separado, sobre cada una de las variables analizadas de manera individual. Además se hace énfasis en cómo el efecto de ambos fertilizantes puede variar, dependiendo del sistema de manejo agrícola que se esté empleando en el suelo.

Propiedades físico-químicas

pH

En esta tesina, los valores de pH variaron en todos los suelos analizados al ser enmendados con biochar o con urea, de manera independiente. Es decir, el agregado de ambas enmiendas en

conjunto, no afectó a esta variable. Como era de esperar, los valores más elevados de pH se evidenciaron con la dosis más altas de biochar. En efecto, resultados similares han sido reportados por otros autores (Liang *et al.* 2014, Purakayastha *et al.* 2019). Liang *et al.* (2014) registraron aumentos de hasta un 60% para esta variable con el agregado de 3% de biochar a un suelo tropical. Respecto al efecto de la urea sobre el pH, en esta tesina, no se observaron variaciones en suelo prístino ni bajo siembra directa. Sin embargo, bajo laboreo intenso, se evidenció un incremento de la variable con el agregado del fertilizante. Se ha indicado que la capacidad buffer del suelo luego del agregado de un fertilizante y la tasa de hidrólisis de la urea, puede variar entre suelos con diferente contenido de arcilla y MO (Han *et al.* 2004). Ambas propiedades serían mayores en suelos con mayor contenido de MO y arcilla (Fenn & Hossner 1985). Es por esta razón, que el aumento del pH observado solamente bajo laboreo intenso, pueda deberse a una hidrólisis más lenta de la urea y a una capacidad buffer menor del suelo bajo este tipo de manejo en comparación con los otros.

Conductividad eléctrica

De manera similar al pH, se observó que la conductividad eléctrica (CE) varió en todos los suelos al ser enmendados con biochar o con urea, de manera independiente. Es decir, ambas enmiendas en conjunto no afectaron significativamente a esta variable. Los valores más bajos de CE fueron registrados bajo laboreo intenso y luego bajo siembra directa. En ninguno de estos suelos se observaron diferencias significativas en la CE al agregar biochar. Estos resultados son consistentes con los observados por Chao *et al.* (2018), Quienes reportaron que dosis del 1 o del 2% de biochar de maní no afectan a la CE. Cambios significativos de esta variable, son evidentes cuándo las dosis de aplicación superan al 5% (Chao *et al.* 2018). Curiosamente, en suelo prístino se observó una relación inversa entre la dosis de biochar aplicada y los valores de CE. Estos resultados, en general, son opuestos a los observados por otros autores (Song *et al.* 2016). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos fueron realizados a corto plazo, a escala de horas o días. Resultados similares al nuestro, fueron observados en estudios realizados a más largo plazo (Ippolito *et al.* 2014). La disminución observada en la CE, luego de un largo período de estabilización entre el suelo y el biochar, podría deberse a una sorción de las sales del medio por parte de la enmienda (Thomas *et al.* 2013, Ippolito *et al.* 2014), observándose en consecuencia una disminución o estabilización de la CE en el suelo. Con respecto a la urea, en general se observó que incrementó los valores de CE en todos los tratamientos, aunque el efecto sólo fue significativo en suelos bajo siembra directa. Resultados similares fueron observados en suelos cultivables enmendados con urea tanto en presencia como en

ausencia de biochar (Song *et al.* 2016). Un mecanismo similar al del biochar ha sido propuesto para la urea, ya que el incremento significativo en la CE luego de la aplicación de urea, podría deberse a la presencia transitoria y repentina de una alta concentración de sales disueltas. Sin embargo luego de un tiempo, la CE tiende a estabilizarse (Song *et al.* 2016). Esto último podría estar sucediendo en suelo prístino y en suelo bajo laboreo intenso enmendados con urea, donde los incrementos de esta variable no fueron significativos.

Materia orgánica, Carbono orgánico total y Nitrógeno total

En esta tesina, en general, se observó que los niveles de NT, COT y MO, incrementaron en todos los suelos al ser enmendados con urea y biochar. En general, estos aumentos estuvieron directamente relacionados con la dosis de biochar aplicada. El aumento de C orgánico en suelos enmendados con biochar, podría explicarse principalmente por dos mecanismos: por un lado, el biochar es en sí mismo una fuente de C, la presencia de C en estructuras aromáticas le confiere una naturaleza recalcitrante (Qambrani *et al.* 2017, Purakayastha *et al.* 2019), y por otro lado, existe evidencia que indica que el biochar inhibe la mineralización del C orgánico en el suelo, contribuyendo de esta manera a su acumulación (Prayogo *et al.* 2014). Además, se ha sugerido que posiblemente el biochar producido a temperaturas de entre 450 y 550° C, posee mayores contenidos de C y N que pueden medirse en la mezcla con el suelo (Ouyang *et al.* 2014).

Actividad enzimática

Las enzimas extracelulares del suelo son los principales catalizadores en la descomposición de la materia orgánica y están involucradas en numerosos ciclos biogeoquímicos de nutrientes (Burns *et al.* 2013). La actividad enzimática y su respuesta al agregado de C y N al suelo, han recibido considerable atención en la última década (Ameloot *et al.* 2015, Song *et al.* 2016, Li *et al.* 2017). En esta tesina, en general, hemos observado que la actividad enzimática incrementa al enmendar los suelos con biochar y urea. Resultados similares han sido observados por otros autores (Song *et al.* 2016). El análisis de componentes principales, mostró que la actividad enzimática del suelo fue diferente para los distintos tratamientos. La actividad B-glucosidasa, ureasa, FDA y DHA, se relacionó más con suelo prístino con dosis del 3 y del 1% de biochar. En cambio, fosfatasa, B-xilanasas y B-glucuronidasas parecieron relacionarse con el tipo de manejo bajo siembra directa con dosis del 3 y del 1% de biochar. Ni el suelo agrícola bajo laboreo intenso, ni las dosis al 0% de

biochar de ningún tratamiento, se relacionaron con la actividad de alguna enzima. Es por esto, que el agrupamiento entre la actividad enzimática y los tratamientos, pareció deberse más a los diferentes tipos de manejo del suelo y a la aplicación de biochar que a la presencia de urea. Las relaciones observadas podrían deberse a las diferencias de COT y de NT entre los suelos con distinto tipo de manejo y a los cambios que ocurren en estas variables luego del agregado de ambas enmiendas a cada uno de los suelos. En efecto, incrementos de la actividad enzimática han sido asociados con aumentos en el COT, NT y el C de la biomasa bacteriana los cuales proveen los sustratos orgánicos para que la actividad enzimática ocurra (Martens *et al.* 1992). El pH y la CE también son afectadas por la aplicación de biochar junto con urea. Sin embargo, la respuesta de cada enzima en particular a las propiedades intrínsecas de cada enmienda y a los cambios físico-químicos que ocurren en el suelo luego de su aplicación, es muy variable. Es por esto que a continuación se discute el efecto de las enmiendas sobre la actividad de cada enzima de manera individual, en todos los suelos estudiados.

Actividad específica de enzimas del Ciclo del C: B-glucosidasa, B-xilanasa y B-glucuronidasa

La actividad de las enzimas B-glucosidasa y B-xilanasa, incrementó en todos los suelos al ser enmendados con biochar y urea. Con excepción en suelo bajo laboreo intenso, en el cuál el agregado de urea con biochar, no afectó a la actividad B-glucosidasa. La actividad de esta última enzima, es muy sensible a cambios del pH (Zhu *et al.* 2017). En efecto, en esta tesina se encontró una correlación positiva entre ambas variables. Aunque nuestros resultados revelaron incrementos del pH en todos los suelos al ser enmendados con biochar, bajo laboreo intenso, el máximo valor de pH alcanzado (con la dosis del biochar del 3%), no superó al del suelo control sin enmendar en suelo prístino. Probablemente el incremento del pH bajo laboreo intenso, no fue suficiente como para estimular la actividad de esta enzima. Salvando la excepción anteriormente mencionada, en general se observó una relación directa entre los valores de actividad enzimática y la dosis de biochar aplicada. Tanto B-glucosidasa como B-xilanasa, son enzimas clave involucradas en el ciclado de C, y los aumentos en su actividad con altas dosis de biochar podrían deberse a incrementos en la fracción lábil de C, ya que los residuos pirolizados sobre la superficie del biochar contribuyen a aumentar dicha fracción, y consecuentemente, pueden ser utilizados como sustrato microbiano (Simarani *et al.* 2018). Además, se ha observado que la aplicación de biochar junto con urea incrementa las concentraciones de N total (Yu *et al.* 2018). Por un lado, se ha propuesto que el biochar sería en sí mismo una fuente de N y por otro lado, la asociación de la urea a la superficie del biochar, evitaría su pérdida por lixiviación o por emisión como gas de efecto invernadero

(Prendergast-Miller *et al.* 2011). Aunque estas enzimas estén muy involucradas con el ciclo del C, en esta tesina se ha observado una correlación positiva entre NT y B-glucosidasa, por lo que el incremento de este nutriente también podría estar favoreciendo la actividad de esta enzima. Curiosamente, B-xilanasa se correlacionó negativamente con el COT y el NT. Wang *et al.* (2015) encontraron una correlación similar e identificaron además una correlación positiva con el contenido de Ca^+ intercambiable. Se ha propuesto que aunque la abundancia de bacterias productoras de estas enzimas pueda correlacionarse positivamente con el COT, no necesariamente hay relación entre éste y la actividad enzimática, ya que los factores limitantes de la reacción enzimática podrían ser otros, como el Ca^+ o la presencia de algún metal pesado (Nair *et al.* 2016).

Por último, la actividad de la enzima B-glucuronidasa varió según el tipo de manejo del suelo y la dosis de biochar. Sin embargo, la aplicación de urea sola o con biochar, no tuvo efecto sobre la actividad de esta enzima. Al igual que para B-glucosidasa y B-xilanasa, en suelo prístino y bajo siembra directa se observó que la actividad incrementó significativamente en relación directa con la dosis de biochar aplicada. Dado que B-glucuronidasa también es una enzima clave en el ciclado de C, los aumentos en su actividad con altas dosis de biochar también podrían atribuirse a incrementos en la fracción lábil de C. En suelo agrícola bajo laboreo intenso, no se observaron diferencias en la actividad enzimática entre el control y la dosis de aplicación del 1%. Mientras que la dosis máxima (3%), disminuyó la actividad de la enzima. La disminución de actividad enzimática como consecuencia de la aplicación de altas dosis de biochar ha sido reportada por varios autores (Demisie *et al.* 2014, Oleszczuk *et al.* 2014, Wang *et al.* 2016) y podría estar asociada con mecanismos de sorción (Foster *et al.* 2018). La enzima B-xilanasa no se correlacionó con el pH, ni la CE, mientras que B-glucuronidasa no se correlacionó con ninguna de las variables físico- químicas evaluadas en esta tesina. De lo anterior se deduce que estas enzimas, no serían tan sensibles a los cambios del medio producidos por el biochar y la urea, como lo es B-glucosidasa.

Actividad específica de enzimas del Ciclo del N y P: Fosfatasa y ureasa

La actividad de las enzimas ureasa y fosfatasa fue modificada al enmendar los suelos con urea y biochar. En todos los casos, se observó que el agregado de biochar al 3% incrementó la actividad de ambas enzimas, tanto en ausencia como en presencia de urea. Se ha señalado que el agregado de biochar, estimularía la actividad de enzimas involucradas en la utilización del N, como lo ureasa (Bailey *et al.* 2011). Además el efecto sería dosis de biochar-dependiente, observándose una relación directa entre éste y la actividad de esta enzima (Wang *et al.* 2015). Como se explicó

anteriormente en las enzimas del ciclo del C, la aplicación de biochar junto con urea incrementa las concentraciones de N total (Prendergast-Miller *et al.* 2011, Yu *et al.* 2018). Además, el incremento de la actividad ureasa luego de la aplicación de biochar, indica que éste afecta significativamente y de manera positiva a la hidrólisis de este fertilizante (Oladele 2019). Con respecto a fosfatasa, resultados similares fueron reportados por otros autores (Du *et al.* 2014, Liu *et al.* 2017). Se ha señalado, que el aumento del pH inducido por el biochar, podría proporcionar condiciones de suelo más adecuadas para la disponibilidad de P o de las comunidades microbianas asociadas al ciclado de este nutriente (Liu *et al.* 2017), incrementando de este modo a la actividad fosfatasa. Curiosamente, cuando el biochar es adicionado en presencia de urea, su efecto sobre la actividad fosfatasa, parece variar según el tipo de manejo del suelo. Mientras que bajo siembra directa se observa que a mayor dosis de biochar mayor actividad (al igual que en los tratamientos sin urea), en suelo prístino y bajo laboreo intenso se observa que el agregado de urea y 1% de biochar disminuye la actividad enzimática.

La actividad ureasa mostró una correlación positiva con el pH, la CE, el contenido de COT y el NT. Por el contrario, la actividad fosfatasa no exhibió una correlación significativa con ninguna de estas variables. Wang *et al.* (2015), luego de correlacionar la actividad de 11 enzimas con COT, NT, K^+ y Ca^+ intercambiables, concluyeron que la relación puede ser positiva o negativa dependiendo de la cantidad de biochar agregado, el contenido de nutrientes en el suelo y la relación entre el biochar con el sustrato específico de cada enzima.

Actividad enzimática generalista: FDA y Deshidrogenasa

Las actividades DHA e hidrolizante de FDA variaron según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea. En general la mayor actividad FDA y DHA se observó en suelo prístino, seguida por el manejo bajo siembra directa y bajo laboreo intenso (**Tabla 3**). Se ha propuesto que ambas actividades enzimáticas estarían fuertemente influenciadas por el contenido de MO del suelo, en efecto se ha demostrado una correlación significativa y positiva entre COT y la actividad FDA (Li *et al.* 2016) y entre COT y DHA (Ameloot *et al.* 2015). En concordancia, en esta tesina, el análisis de correlación de Pearson entre el FDA y el COT exhibió una correlación altamente significativa ($r=0,95$. $P < 0,001$), mientras que para DHA y COT fue $r=0,82$ ($p < 0,001$). El efecto de la aplicación conjunta de biochar y urea fue diferente en los tres tipos de manejo del suelo. Particularmente para FDA se observó que el incremento en la dosis de biochar fue estimulador en suelos bajo siembra directa, resultó ser inhibitorio en suelo prístino y no tuvo ningún efecto bajo

laboreo intenso. Mientras que para DHA la aplicación de urea junto con biochar sólo pareció ejercer efecto al 3% únicamente bajo siembra directa, mientras que en suelo prístino y bajo laboreo intenso no se observaron variaciones en la actividad enzimática. Nuestros resultados sugieren que la fertilización con urea y biochar es capaz de incrementar la actividad microbiana total, en suelos que presentan cierto grado de deterioro edáfico. Por el contrario, en suelos con alto contenido de MO podría existir una relación inversa entre la cantidad de biochar aplicada y la actividad FDA, o no tener efecto para el caso de DHA.

Biomasa y estructura de las comunidades microbianas

Los análisis de perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos totales (PLFAs) para bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, actinobacterias y PLFA totales, variaron según el tipo de manejo del suelo, la dosis de biochar y la aplicación de urea con interacción entre los tres factores. El análisis de CP explicó 58.2% de la variación total (CP1 32% y CP2 26,2%). En general, las dosis más altas de biochar se localizaron en el primero y segundo cuadrante, mientras que las dosis más bajas lo hicieron en el tercero y cuarto cuadrante. No se encontró una separación clara entre los distintos tipos de manejo del suelo. No obstante, la abundancia de actinobacterias y la relación G+/G- pareció asociarse a los tratamientos bajo siembra directa y laboreo intenso y dosis del 3% de biochar (ya sea en presencia o ausencia de urea). El agregado de biochar con urea al suelo, ha sido asociado a variaciones en la abundancia de los taxones microbianos y a cambios en la estructura de las comunidades (Ameloot *et al.* 2015, Yu *et al.* 2018). Sin embargo, la respuesta de cada taxón en particular a las propiedades intrínsecas de cada enmienda y a los cambios físico-químicos que ocurren en el suelo luego de su aplicación, es muy variable. Es por esto que a continuación se discute el efecto de las enmiendas sobre cada taxón, en todos los suelos estudiados.

Actinobacterias

Las mayores poblaciones de actinobacterias fueron registradas bajo laboreo intenso. Además, en general, la aplicación de biochar incrementó la abundancia de este taxón en todos los tratamientos. De manera similar, altas poblaciones de actinobacterias fueron reportadas por otros autores, en diversos tipos de suelos luego de ser enmendados con biochar (Khodadad *et al.* 2011, Ameloot *et al.* 2015). El incremento de este taxón, podría deberse a que estos organismos son capaces de utilizar sustratos complejos y persistentes, como por ejemplo, el C aromático presente en este tipo de enmiendas (Watzinger *et al.* 2014, Yu *et al.* 2018). Además, entre todos los microorganismos del suelo, las actinobacterias son las que poseen menor tamaño, por lo que son las mejor protegidas dentro de los poros del biochar (Warnock *et al.* 2007, Gul *et al.* 2015). La

aplicación de urea y biochar en conjunto, pareció ser menos efectiva que el biochar solo para aumentar la abundancia de este taxón. En efecto, no se observaron cambios en la abundancia de actinobacterias bajo siembra directa ni laboreo intenso cuando ambas enmiendas fueron adicionadas en conjunto. Resultados similares fueron reportados por Yu *et al.* (2018). En esta tesina, la abundancia de actinobacterias exhibió una correlación negativa con la CE, el COT y el NT. Resultados similares fueron reportados por otros autores (L. Zhang *et al.* 2018). El hecho de que en nuestro trabajo la mayor abundancia de actinobacterias se encontrase en suelo bajo laboreo intenso, podría deberse a este tipo de correlación, ya que en este suelo, se registraron los menores valores para CE, COT y NT.

Bacterias Gram positivas (G+), Gram negativas (G-) y relación G+/G-

La abundancia de bacterias G+ y G-, en general, exhibió un incremento al aumentar las dosis de biochar en suelo prístino, ya sea en ausencia o en presencia de urea, particularmente al enmendar con biochar al 3%. Mientras que en suelo bajo siembra directa y bajo laboreo intenso, el efecto de ambas enmiendas sobre la abundancia de estos grupos bacterianos, pareció variar según el tipo de manejo. Mientras que la aplicación conjunta de urea y biochar pareció no afectar la abundancia de bacterias G- en estos suelos, el efecto pareció ser nulo o negativo para G+. Es decir, para este último taxón, en general, la abundancia bacteriana disminuyó al incrementar la dosis de biochar.

Se ha propuesto que las poblaciones de G+ y G- varían en el tiempo luego de la aplicación del biochar. Aunque ambas poblaciones incrementarían, las G- lo hacen en una primera etapa, utilizando la fracción de C lábil presente en el biochar. Mientras que las G+, aumentarían luego de la semana 16 aproximadamente, cuando comienza a estar más disponible la fracción aromática de C (Mitchell *et al.* 2015). De este modo, el incremento de la abundancia de bacterias G+ observada en suelo prístino (con y sin urea) y bajo siembra directa sin urea, podría deberse a que luego de 20 semanas de incubación, el C aromático del biochar comience a prevalecer por sobre la fracción lábil, favoreciendo el desarrollo de este taxón. Curiosamente, bajo siembra directa con urea y bajo laboreo intenso con urea y biochar al 1%, la abundancia de G+ disminuye con el agregado de biochar. Quizás, al tratarse de suelos con propiedades físico- químicas diferentes, la velocidad a la que ocurren las reacciones enzimáticas sea diferente a las del suelo prístino (con y sin urea) y siembra directa sin urea, y aún prevalezca como sustrato la fracción lábil del C del biochar por sobre la fracción aromática. Por otro lado, también se ha relacionado al incremento de G+ y G-, con aumentos en la estabilidad de los agregados (Zhu *et al.* 2017). Una vez que el biochar es incorporado a la matriz edáfica, actúa como agente aglutinante de la MO, mejorando la estabilidad de los mismos

(Sun & Lu 2014). En suelos bajo siembra directa con urea y bajo laboreo intenso con urea, quizás, la estabilidad de los agregados es menor que la observada en los otros tratamientos. En efecto, hay evidencias que indican que la fertilización nitrogenada a largo plazo, impactaría negativamente sobre la estabilidad de los agregados (Brtnický *et al.* 2017). Quizás suelos bajo laboreo intenso, son más sensibles a este efecto adverso del fertilizante que un suelo prístino con mayor contenido de MO, evitando de este modo la estabilización de los agregados, con la consecuente disminución de G+. Sin embargo, más estudios deben realizarse para corroborar esta hipótesis.

Las bacterias G- incrementaron solamente en suelo prístino y bajo laboreo intenso en ausencia de urea. A diferencia de las G+, este taxón exhibió una correlación positiva con el pH, CE, COT y el NT. Teniendo en cuenta que las tres primeras variables exhibieron un incremento significativo luego del agregado de biochar y de urea, podría pensarse que el cambio en la abundancia de G- esté dado por una mejora de las propiedades físico-químicas en dichos tratamientos luego del agregado de ambas enmiendas. En efecto, incrementos del pH y de la fracción lábil de C luego del agregado de urea y biochar, han sido asociados con incrementos en la abundancia de bacterias G- (Yu *et al.* 2018).

Por último, la relación G+/ G- en esta tesina incrementó (suelo prístino y bajo siembra directa) o se mantuvo constante (suelo bajo laboreo intenso) luego del agregado de biochar. Estos resultados fueron similares a los observados por Paz-Ferreiro *et al.* (2015), quienes sugieren que la importancia del modelado de estas comunidades radica no solo en el biochar como fuente de energía para las comunidades microbianas, sino también del tipo de manejo del suelo. Sumado a lo anterior, Yu *et al.* (2018), observaron que, aunque la abundancia absoluta de los taxones por lo general incrementa luego del agregado de urea y biochar, la abundancia relativa de los mismos no es afectada, por lo que la estructura de las comunidades se mantiene estable dentro de una temporada de crecimiento.

Hongos micorrícicos arbusculares

En esta tesina se registraron cambios en las poblaciones de hongos micorrícicos arbusculares solamente en el suelo prístino al ser enmendado con 3% de biochar. El agregado de urea no tuvo efecto sobre la abundancia de esta comunidad microbiana, ni sola, ni al ser aplicada con biochar en ninguno de los tipos de manejo analizados. Se ha sugerido que los cambios en la abundancia de estos hongos estarían fuertemente relacionados con el tipo de manejo del suelo en el cuál es aplicado el

biochar. En general, la biomasa de hongos micorrícicos arbusculares resulta ser mayor en suelos donde el incremento del pH es más notable luego de la aplicación de la enmienda (Paz-Ferreiro *et al.* 2015). Aunque en esta tesina no se observó una correlación significativa entre esta variable física del suelo y la población de micorrizas, el suelo prístino fue el que alcanzó valores de pH más altos luego de la adición de biochar.

Hongos

La aplicación de biochar (1 y 3%) incrementó las poblaciones de hongos saprofitos solamente en suelo prístino y bajo siembra directa, mientras que bajo laboreo intenso no tuvo efecto significativo. La aplicación de urea pareció no ser tan determinante sobre la abundancia de este taxón, ya que cuando ambas enmiendas se aplicaron en conjunto, no se registraron cambios en la misma en ninguno de los suelos estudiados. Ambas dosis de biochar (1 y 3%), produjeron una disminución de la relación bacterias/hongos bajo siembra directa, probablemente causado por el incremento de biomasa fúngica en dicho tratamiento. En concordancia, se ha reportado que el agregado de biochar puede causar un incremento de las poblaciones fúngicas, principalmente asociado a la exploración y colonización de los poros del material pirolizado (Jaafar *et al.* 2014). Por otro lado, (tal como se mencionó para la relación G+/G-) nuestros resultados para suelo prístino y bajo laboreo intenso, concuerdan con los de Yu *et al.* (2018). Dichos autores observaron cambios de la abundancia absoluta de hongos y bacterias, pero no de su abundancia relativa. Lo cual estaría indicando que ambas enmiendas en conjunto promueven el aumento de la biomasa total sin operar cambios en la estructura de las comunidades.

PLFA totales

Es ampliamente conocido que los PLFA totales son indicadores sensibles de la biomasa microbiana total (Wixon & Balser 2013). Nuestro estudio también detectó incrementos significativos de PLFA total luego de la aplicación de biochar y de urea bajo siembra directa y de biochar solo bajo laboreo intenso. Por un lado, el incremento de la biomasa total luego de la aplicación de urea y biochar, ha sido explicada principalmente por aumentos en el pH del suelo (Yu *et al.* 2018). Aunque la biomasa total no se relacionó significativamente con esta variable, es cierto que el pH incrementó en todos los tratamientos con la adición de estas enmiendas en comparación con los controles sin enmendar. Por otro lado, el incremento en la biomasa microbiana observada en suelos tratados con

biochar puede ser principalmente atribuido a una mejora en las propiedades físico-químicas del suelo, al aumento de los niveles de C disponible, agua y nutrientes y/o al incremento en la protección de microorganismos frente a sus predadores (Chen *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2017). Se ha propuesto que los poros contenidos en el biochar a lo largo de todo su volumen, pueden servir de hábitat y refugio para los microorganismos (Zhu *et al.* 2017). En efecto el biochar proporciona un volumen de poros habitables por unidad de partícula, mayor que el del suelo (Quilliam *et al.* 2012).

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesina indicaron que la aplicación de biochar junto a un fertilizante mineral nitrogenado (urea) es capaz de modificar las características físico-químicas y microbiológicas en suelo de uso agrícola sujeto a diferentes tipos de manejo, observándose un efecto más significativo bajo laboreo intenso. Los tipos de manejo aplicados al suelo separan a los tratamientos en grupos bien diferenciados. Si bien, se observó un claro efecto de la combinación de urea y biochar para todas las variables analizadas, la respuesta fue más evidente para la estructura de las comunidades microbianas, luego para la actividad enzimática y por último para las variables físico-químicas.

Respecto a las variables físico-químicas se observó que la aplicación de biochar, principalmente en dosis alta, redujo la acidez en todos los tipos de manejo evaluados. Mientras que urea, sólo tendría este efecto bajo laboreo intenso. Ambos fertilizantes aplicados en conjunto, en general, incrementan el contenido de COT y NT en todos los tratamientos, con énfasis en suelo bajo laboreo intenso. También aumentan la actividad de las enzimas del Ciclo del C, del P y del N. No obstante, la actividad específica de B-glucuronidasa no fue afectada por la presencia de urea, siendo preponderante el rol del biochar. La actividad de enzimas generalistas fue muy variable dependiendo del tipo de manejo del suelo. Aunque en general se observó que dosis del 3% de biochar incrementan la actividad tanto FDA como DHA, la tendencia no fue clara al agregar urea. Incluso cuando biochar y urea se aplicaron en conjunto la actividad FDA disminuyó en el suelo prístino. Finalmente, la presencia de biochar, en ausencia de urea, modificó la estructura de las comunidades microbianas, principalmente en siembra directa y laboreo intenso. Aunque en este último tipo de manejo fue menos evidente que bajo siembra directa. En general, se observaron aumentos de la densidad de todos los taxones microbianos analizados al ser tratados con biochar, mientras que la aplicación de ambos fertilizantes en conjunto pareció ejercer menor efecto.

Aunque la aplicación de biochar y urea produce importantes incrementos del pH, COT, NT y de la actividad enzimática, tendencias similares pueden observarse al aplicar biochar sin el fertilizante mineral. Además, sólo el biochar parece afectar a la estructura de las comunidades microbianas. Por lo que el rol del biochar, sobre los cambios producidos en las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo, parece ser más determinante que el de la urea.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G., & Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 943–951. DOI: 10.1016/S0038-0717(00)00244-3
- Ameloot, N., Graber, E. R., Verheijen, F. G. A., & De Neve, S. 2013. Interactions between biochar stability and soil organisms: Review and research needs. *European Journal of Soil Science*, 64(4), 379–390. DOI: 10.1111/ejss.12064
- Ameloot, Nele, Sleutel, S., Das, K. C., Kanagaratnam, J., & de Neve, S. 2015. Biochar amendment to soils with contrasting organic matter level: Effects on N mineralization and biological soil properties. *GCB Bioenergy*, 7(1), 135–144. DOI: 10.1111/gcbb.12119
- Arif, M., Ilyas, M., Riaz, M., Ali, K., Shah, K., Ul Haq, I., & Fahad, S. 2017. Biochar improves phosphorus use efficiency of organic-inorganic fertilizers, maize-wheat productivity and soil quality in a low fertility alkaline soil. *Field Crops Research*, 214(August), 25–37. DOI: 10.1016/j.fcr.2017.08.018
- Bailey, V. L., Fansler, S. J., Smith, J. L., & Bolton, H. 2011. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(2), 296–301. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.10.014
- Bot, A., & Benites, J. 2005. The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food production.
- Brown, S., & Lugo, A. 1990. Effects of forest clearing and succession of the carbon and nitrogen 80 Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Ecológico-Ambiental content of soils in Puerto Rico and US Virgin Islands. *Plant and Soil*, 124, 53–64.
- Brtnický, M., Elbl, J., Dvořáčková, H., Kynický, J., & Hladký, J. 2017. Changes in soil aggregate stability induced by mineral nitrogen fertilizer application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(5), 1477–1482. DOI: 10.11118/actaun201765051477
- Bruun, E. W., Ambus, P., Egsgaard, H., & Hauggaard-Nielsen, H. 2012. Effects of slow and fast pyrolysis biochar on soil C and N turnover dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 73–79. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.11.019

- Burke, I., Yonker, C., Parton, W., Cole, C., Flach, K., & Schimel, D. 1989. Texture, Climate, and Cultivation Effects on Soil Organic Matter Content in U.S. Grassland Soils | Ingrid Burke. *Soil Science Society of America Journal*, 53, 800–805.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., & Zoppini, A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.11.009
- Carreño, L., Frank, F. C., & Viglizzo, E. F. 2012. Tradeoffs between economic and ecosystem services in Argentina during 50 years of land-use change. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 154, 68–77. DOI: 10.1016/j.agee.2011.05.019
- Chao, X., Qian, X., Han-hua, Z., Shuai, W., Qi-hong, Z., Dao-you, H., & Yang-zhu, Z. 2018. Effect of biochar from peanut shell on speciation and availability of lead and zinc in an acidic paddy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 554–561. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.057
- Chen, J., Li, S., Liang, C., Xu, Q., Li, Y., Qin, H., & Fuhrmann, J. J. 2017. Response of microbial community structure and function to short-term biochar amendment in an intensively managed bamboo (*Phyllostachys praecox*) plantation soil: Effect of particle size and addition rate. *Science of the Total Environment*, 574, 24–33. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.190
- Chen, Y., Shinogi, Y., & Taira, M. 2010. Influence of biochar use on sugarcane growth, soil parameters, and groundwater quality. *Soil Research*, 48(7), 526. DOI: 10.1071/SR10011
- Demisie, W., Liu, Z., & Zhang, M. 2014. Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil. *Catena*, 121, 214–221. DOI: 10.1016/j.catena.2014.05.020
- Dempster, D. N., Jones, D. L., & Murphy, D. V. 2012. Organic nitrogen mineralisation in two contrasting agro-ecosystems is unchanged by biochar addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 48, 47–50. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.01.013
- Du, Z., Wang, Y., Huang, J., Lu, N., Liu, X., Lou, Y., & Zhang, Q. 2014. Consecutive biochar application alters soil enzyme activities in the winter wheat-growing season. *Soil Science*, 179(2), 75–83. DOI: 10.1097/SS.0000000000000050

- Ducey, T. F., Ippolito, J. A., Cantrell, K. B., Novak, J. M., & Lentz, R. D. 2013. Addition of activated switchgrass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances. *Applied Soil Ecology*, 65, 65–72. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.01.006
- Elzobair, K. A., Stromberger, M. E., & Ippolito, J. A. 2016. Stabilizing effect of biochar on soil extracellular enzymes after a denaturing stress. *Chemosphere*, 142, 114–119. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.018
- Fenn, L. B., & Hossner, L. R. 1985. Ammonia Volatilization from Ammonium or Ammonium-Forming Nitrogen Fertilizers. pp. 123–169. .
- Foster, E., Fogle, E., & Cotrufo, M. 2018. Sorption to Biochar Impacts β -Glucosidase and Phosphatase Enzyme Activities. *Agriculture*, 8(10), 158. DOI: 10.3390/agriculture8100158
- Garcia, C., Hernandez, T., & Costa, F. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28(1–2), 123–134. DOI: 10.1080/00103629709369777
- Gifford, R. M. 1994. The global carbon cycle: A viewpoint on the missing sink. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21(1), 1–15. DOI: 10.1071/PP9940001
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. 2010, February 12. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*. DOI: 10.1126/science.1185383
- Gul, S., Whalen, J. K., Thomas, B. W., Sachdeva, V., & Deng, H. 2015. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 206, 46–59. DOI: 10.1016/J.AGEE.2015.03.015
- Han, K. H., Choi, W. J., Han, G. H., Yun, S. I., Yoo, S. H., & Ro, H. M. 2004. Urea-nitrogen transformation and compost-nitrogen mineralization in three different soils as affected by the interaction between both nitrogen inputs. *Biology and Fertility of Soils*, 39(3), 193–199. DOI: 10.1007/s00374-003-0704-4
- He, L. li, Zhong, Z. ke, & Yang, H. min. 2017. Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(3), 704–712. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61420-X

- Ippolito, J. A., Stromberger, M. E., Lentz, R. D., & Dungan, R. S. 2014. Hardwood biochar influences calcareous soil physicochemical and microbiological status. *Journal of Environmental Quality*, 43(2), 681–689. DOI: 10.2134/jeq2013.08.0324
- Jaafar, N. M., Clode, P. L., & Abbott, L. K. 2014. Microscopy observations of habitable space in biochar for colonization by fungal hyphae from soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(3), 483–490. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60703-0
- Jones, D. L., Rousk, J., Edwards-Jones, G., DeLuca, T. H., & Murphy, D. V. 2012. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 113–124. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.10.012
- Kandeler, E., & Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68–72. DOI: 10.1007/BF00257924
- Khodadad, C. L. M., Zimmerman, A. R., Green, S. J., Uthandi, S., & Foster, J. S. 2011. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(2), 385–392. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.11.005
- Kolb, S. E., Fermanich, K. J., & Dornbush, M. E. 2009. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils. *Soil Science Society of America Journal*, 73(4), 1173–1181. DOI: 10.2136/sssaj2008.0232
- Lal, R. 2002. Soil carbon dynamics in cropland and rangeland. In: *Environmental Pollution*. Vol. 116, pp. 353–362. . DOI: 10.1016/S0269-7491(01)00211-1
- Lehmann, J. 2007, May 10. A handful of carbon. *Nature* Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/447143a
- Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., & Crowley, D. 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.04.022
- Li, J., Wang, D., Fan, W., He, R., Yao, Y., Sun, L., Zhao, X., & Wu, J. 2017. Comparative effects of different organic materials on nematode community in continuous soybean monoculture soil. *Applied Soil Ecology*. DOI: 10.1016/J.APSOIL.2017.12.013

- Li, M., Nie, H., Zhang, S., Zhou, F., Han, D., Zhan, L., Tian, Y., Shi, M., & Zhang, E. 2016. Correlation between FDA enzyme activity and soil fertility under combining application organic and nitrogen fertilizer in facility vegetable field. *Acta Horticulturae Sinica*, 47, 907–917.
- Li, S., Liang, C., & Shangguan, Z. 2017. Effects of apple branch biochar on soil C mineralization and nutrient cycling under two levels of N. *Science of the Total Environment*, 607–608, 109–119. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.275
- Liang, C., Zhu, X., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., & Paz-Ferreiro, J. 2014. Biochar alters the resistance and resilience to drought in a tropical soil. *Environmental Research Letters*, 9(6). DOI: 10.1088/1748-9326/9/6/064013
- Liang, Q., Chen, H., Gong, Y., Fan, M., Yang, H., Lal, R., & Kuzyakov, Y. 2012. Effects of 15 years of manure and inorganic fertilizers on soil organic carbon fractions in a wheat-maize system in the North China Plain. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. DOI: 10.1007/s10705-011-9469-6
- Liu, S., Meng, J., Jiang, L., Yang, X., Lan, Y., Cheng, X., & Chen, W. 2017. Rice husk biochar impacts soil phosphorous availability, phosphatase activities and bacterial community characteristics in three different soil types. *Applied Soil Ecology*, 116, 12–22. DOI: 10.1016/j.apsoil.2017.03.020
- Lu, H., Li, Z., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., & Paz-Ferreiro, J. 2015. Combining phytoextraction and biochar addition improves soil biochemical properties in a soil contaminated with Cd. *Chemosphere*, 119, 209–216. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.024
- Manuel-Navarrete, D., Gallopín, G. C., Blanco, M., Díaz-Zorita, M., Ferraro, D. O., Herzer, H., Laterra, P., Murmis, M. R., Podestá, G. P., Rabinovich, J., Satorre, E. H., Torres, F., & Viglizzo, E. F. 2009. Multi-causal and integrated assessment of sustainability: The case of agriculturization in the Argentine Pampas. *Environment, Development and Sustainability*, 11(3), 621–638. DOI: 10.1007/s10668-007-9133-0
- Manuel-Navarrete, D., Gallopín, G. C., & United Nations. Economic Commission for Latin America and the Caribbean. 2007. Integración de políticas, sostenibilidad y agriculturización en la pampa argentina y áreas extrapampeanas. Naciones Unidad, CEPAL: p. 34.

- Martens, D. A., Johanson, J. ., & Frankenberger Jr, W. T. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Science*, 153, 53–61.
- Masto, R. E., Kumar, S., Rout, T. K., Sarkar, P., George, J., & Ram, L. C. 2013. Biochar from water hyacinth (*Eichornia crassipes*) and its impact on soil biological activity. *Catena*, 111, 64–71. DOI: 10.1016/j.catena.2013.06.025
- Mitchell, P. J., Simpson, A. J., Soong, R., & Simpson, M. J. 2015. Shifts in microbial community and water-extractable organic matter composition with biochar amendment in a temperate forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 244–254. DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.11.017
- Mukherjee, A., Lal, R., & Zimmerman, A. R. 2014. Effects of biochar and other amendments on the physical properties and greenhouse gas emissions of an artificially degraded soil. *Science of the Total Environment*. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.141
- Nair, A., Nambissan, V., Rane, T., Nohwar, N., & Mishra, S. 2016. EFFECT OF SOIL QUALITY ON XYLANASE ACTIVITY OF XYLANOLYTIC BACTERIA. *Int. J. Environmental Sciences*, 5(4), 203–210.
- Nelissen, V., Rütting, T., Huygens, D., Staelens, J., Ruysschaert, G., & Boeckx, P. 2012. Maize biochars accelerate short-term soil nitrogen dynamics in a loamy sand soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 55, 20–27. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.05.019
- Oladele, S. O. 2019. Effect of biochar amendment on soil enzymatic activities, carboxylate secretions and upland rice performance in a sandy clay loam Alfisol of Southwest Nigeria. *Scientific African*, 4. DOI: 10.1016/j.sciaf.2019.e00107
- Oleszczuk, P., Joško, I., Futa, B., Pasiieczna-Patkowska, S., Pałys, E., & Kraska, P. 2014. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. *Geoderma*, 214–215, 10–18. DOI: 10.1016/j.geoderma.2013.10.010
- Ouyang, L., Tang, Q., Yu, L., & Zhang, R. 2014. Effects of amendment of different biochars on soil enzyme activities related to carbon mineralisation. *Soil Research*, 52(7), 706–716. DOI: 10.1071/SR14075
- Paz-Ferreiro, J., Liang, C., Fu, S., Mendez, A., & Gasco, G. 2015. The effect of biochar and its interaction with the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on soil microbial community

structure in tropical soils. PLoS ONE, 10(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0124891

- Prayogo, C., Jones, J. E., Baeyens, J., & Bending, G. D. 2014. Impact of biochar on mineralisation of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure. *Biology and Fertility of Soils*, 50(4), 695–702. DOI: 10.1007/s00374-013-0884-5
- Prendergast-Miller, M. T., Duvall, M., & Sohi, S. P. 2011. Localisation of nitrate in the rhizosphere of biochar-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2243–2246. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.07.019
- Prommer, J., Wanek, W., Hofhansl, F., Trojan, D., Offre, P., Urich, T., Schleper, C., Sassmann, S., Kitzler, B., Soja, G., & Hood-Nowotny, R. C. 2014. Biochar Decelerates Soil Organic Nitrogen Cycling but Stimulates Soil Nitrification in a Temperate Arable Field Trial. *PLoS ONE*, 9(1), e86388. DOI: 10.1371/journal.pone.0086388
- Purakayastha, T. J., Bera, T., Bhaduri, D., Sarkar, B., Mandal, S., Wade, P., Kumari, S., Biswas, S., Menon, M., Pathak, H., & Tsang, D. C. W. 2019. A review on biochar modulated soil condition improvements and nutrient dynamics concerning crop yields: Pathways to climate change mitigation and global food security. *Chemosphere*, 227, 345–365. DOI: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.03.170
- Qambrani, N. A., Rahman, M. M., Won, S., Shim, S., & Ra, C. 2017. Biochar properties and eco-friendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.057
- Quilliam, R. S., Marsden, K. A., Gertler, C., Rousk, J., DeLuca, T. H., & Jones, D. L. 2012. Nutrient dynamics, microbial growth and weed emergence in biochar amended soil are influenced by time since application and reapplication rate. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 158, 192–199. DOI: 10.1016/j.agee.2012.06.011
- Reicosky, D. C. 2016. Long-Term Effect of Moldboard Plowing on Tillage-Induced CO₂ Loss., 111–122. DOI: 10.1201/9781420032291-12
- Sadaf, J., Shah, G. A., Shahzad, K., Ali, N., Shahid, M., Ali, S., Hussain, R. A., Ahmed, Z. I., Traore, B., Ismail, I. M. I., & Rashid, M. I. 2017. Improvements in wheat productivity and

soil quality can accomplish by co-application of biochars and chemical fertilizers. *Science of the Total Environment*, 607–608, 715–724. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.178

- Sadeghi, S. H., Ghavimi Panah, M. H., Younesi, H., & Kheirfam, H. 2018. Ameliorating some quality properties of an erosion-prone soil using biochar produced from dairy wastewater sludge. *CATENA*, 171, 193–198. DOI: 10.1016/J.CATENA.2018.07.018
- Simarani, K., Azlan Halmi, M. F., & Abdullah, R. 2018. Short-term effects of biochar amendment on soil microbial community in humid tropics. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(13), 1847–1860. DOI: 10.1080/03650340.2018.1464149
- Singh, B. P., Hatton, B. J., Singh, B., Cowie, A. L., & Kathuria, A. 2010. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. *Journal of Environmental Quality*, 39(4), 1224–1235. DOI: 10.2134/jeq2009.0138
- Song, D., Xi, X., Huang, S., Liang, G., Sun, J., Zhou, W., & Wang, X. 2016. Short-term responses of soil respiration and C-cycle enzyme activities to additions of biochar and urea in a calcareous soil. *PLoS ONE*, 11(9), 1–18. DOI: 10.1371/journal.pone.0161694
- Steinbeiss, S., Gleixner, G., & Antonietti, M. 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1301–1310. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.03.016
- Stemmer, M. 2004. Multiple-substrate enzyme assays: a useful approach for profiling enzyme activity in soils? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 519–527. DOI: 10.1016/J.SOILBIO.2003.11.004
- Sun, F., & Lu, S. 2014. Biochars improve aggregate stability, water retention, and pore-space properties of clayey soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177(1), 26–33. DOI: 10.1002/jpln.201200639
- Taghizadeh-Toosi, A., Clough, T. J., Sherlock, R. R., & Condon, L. M. 2012. A wood based low-temperature biochar captures $\text{NH}_3\text{-N}$ generated from ruminant urine-N, retaining its bioavailability. *Plant and Soil*, 353(1–2), 73–84. DOI: 10.1007/s11104-011-1010-9
- Thomas, S. C., Frye, S., Gale, N., Garmon, M., Launchbury, R., Machado, N., Melamed, S., Murray, J., Petroff, A., & Winsborough, C. 2013. Biochar mitigates negative effects of salt additions on two herbaceous plant species. *Journal of Environmental Management*, 129, 62–

68. DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.05.057

- Timm, J. 2004. Variabilidad Climática y Cambios en el Uso de la Tierra en la Región Pampeana Argentina. Universidad Nacional de La Pampa. p. 42 pp.
- Ulyett, J., Sakrabani, R., Kibblewhite, M., & Hann, M. 2014. Impact of biochar addition on water retention, nitrification and carbon dioxide evolution from two sandy loam soils. *European Journal of Soil Science*, 65(1), 96–104. DOI: 10.1111/ejss.12081
- Ventura, M., Sorrenti, G., Panzacchi, P., George, E., & Tonon, G. 2013. Biochar reduces short-term nitrate leaching from a horizon in an apple orchard. *Journal of Environmental Quality*, 42(1), 76–82. DOI: 10.2134/jeq2012.0250
- Vestal, J. R., & White, D. C. 1989. Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*, 39(8), 535–41.
- Viglizzo, E. F., Carreño, L. V., Pereyra, H., F., R., Clatt, J., Pincén, D., & Jobbaghy, E. G. 2012. Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. *Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Ecológico-Ambiental*.p. 106.
- Viglizzo, E. F., Frank, F., Bernardos, J., Buschiazzi, D. E., & Cabo, S. 2006. A rapid method for assessing the environmental performance of commercial farms in the pampas of Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 117(1–3), 109–134. DOI: 10.1007/s10661-006-7981-y
- Walkley, A., & Black, I. A. 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003
- Wang, J., Xiong, Z., & Kuzyakov, Y. 2016. Biochar stability in soil: Meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy*, 8(3), 512–523. DOI: 10.1111/gcbb.12266
- Wang, X., Song, D., Liang, G., Zhang, Q., Ai, C., & Zhou, W. 2015. Maize biochar addition rate influences soil enzyme activity and microbial community composition in a fluvo-aquic soil. *Applied Soil Ecology*, 96, 265–272. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.08.018

- Warnock, D. D., Lehmann, J., Kuyper, T. W., & Rillig, M. C. 2007, November. Mycorrhizal responses to biochar in soil - Concepts and mechanisms. *Plant and Soil*. DOI: 10.1007/s11104-007-9391-5
- Watzinger, A., Feichtmair, S., Kitzler, B., Zehetner, F., Kloss, S., Wimmer, B., Zechmeister-Boltenstern, S., & Soja, G. 2014. Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized ¹³C-labelled biochar as revealed by ¹³C PLFA analyses: Results from a short-term incubation and pot experiment. *European Journal of Soil Science*, 65(1), 40–51. DOI: 10.1111/ejss.12100
- Wixon, D. L., & Balser, T. C. 2013. Toward conceptual clarity: PLFA in warmed soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 769–774. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.08.016
- Xu, H. J., Wang, X. H., Li, H., Yao, H. Y., Su, J. Q., & Zhu, Y. G. 2014. Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape. *Environmental Science and Technology*, 48(16), 9391–9399. DOI: 10.1021/es5021058
- Yanardağ, İ. H., Zornoza, R., Cano, A. F., Yanardağ, A. B., & Mermut, A. R. 2015. Evaluation of carbon and nitrogen dynamics in different soil types amended with pig slurry, pig manure and its biochar by chemical and thermogravimetric analysis. *Biology and Fertility of Soils*, 51(2), 183–196. DOI: 10.1007/s00374-014-0962-3
- Yu, H., Zou, W., Chen, J., Chen, H., Yu, Z., Huang, J., Tang, H., Wei, X., & Gao, B. 2019, February 15. Biochar amendment improves crop production in problem soils: A review. *Journal of Environmental Management Academic Press*. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.10.117
- Yu, L., Yu, M., Lu, X., Tang, C., Liu, X., Brookes, P. C., & Xu, J. 2018. Combined application of biochar and nitrogen fertilizer benefits nitrogen retention in the rhizosphere of soybean by increasing microbial biomass but not altering microbial community structure. *Science of the Total Environment*. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.018
- Zelles, L. 1999, May. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*. DOI: 10.1007/s003740050533
- Zhang, G., Guo, X., Zhu, Y., Liu, X., Han, Z., Sun, K., Ji, L., He, Q., & Han, L. 2018. The

effects of different biochars on microbial quantity, microbial community shift, enzyme activity, and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Geoderma*, 328, 100–108. DOI: 10.1016/J.GEODERMA.2018.05.009

- Zhang, L., Jing, Y., Xiang, Y., Zhang, R., & Lu, H. 2018. Responses of soil microbial community structure changes and activities to biochar addition: A meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 643, 926–935. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.231
- Zheng, H., Wang, Z., Deng, X., Herbert, S., & Xing, B. 2013. Impacts of adding biochar on nitrogen retention and bioavailability in agricultural soil. *Geoderma*, 206, 32–39. DOI: 10.1016/j.geoderma.2013.04.018
- Zhu, X., Chen, B., Zhu, L., & Xing, B. 2017. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. *Environmental Pollution*, 227, 98–115. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.04.032